

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Estudio de los contaminantes en polen mediante GCMS y microscopía electrónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de los Desamparados Escribano Otero

Directores

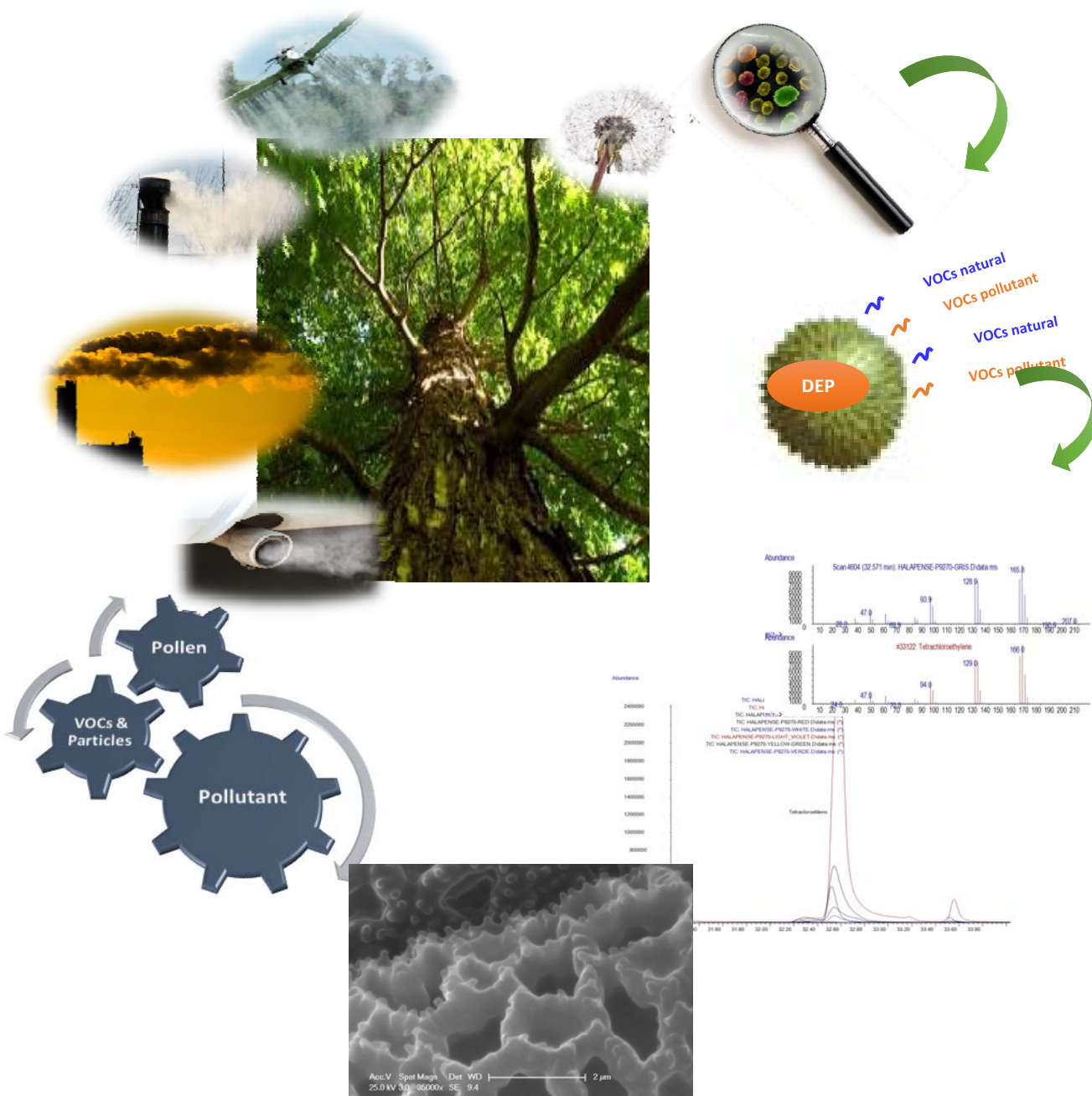
Luis M^a Polo Díez

Nour Kayali Sayadi

Madrid, 2016



ESTUDIO DE CONTAMINANTES EN POLEN MEDIANTE GCMS Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**ESTUDIO DE CONTAMINANTES EN POLEN
MEDIANTE GCMS Y MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DE LOS DESAMPARADOS ESCRIBANO OTERO

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



ESTUDIO DE CONTAMINANTES EN POLEN MEDIANTE GCMS Y MISCROCOPIA ELECTRÓNICA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

MARÍA DE LOS DESAMPARADOS ESCRIBANO OTERO

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

DR. LUIS MARÍA POLO DÍEZ

DR. M. NOUR KAYALI SAYADI



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 26
Fax: 91 394 41 60

LUIS MARÍA POLO DÍEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, Y MOHAMED NOUR KAYALI SAYADI, RESPONSABLE TÉCNICO DEL CAI DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, CERTIFICAN:

QUE EL PRESENTE TRABAJO TITULADO "ESTUDIO DE CONTAMINANTES EN POLEN MEDIANTE GCMS Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA" HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y EN EL CAI DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS BAJO NUESTRA DIRECCIÓN, CONSTITUYENDO LA TESIS DOCTORAL DE SU AUTORA.

DR. LUIS MARÍA POLO DÍEZ

DR. M. NOUR KAYALI SAYADI

MADRID, JULIO 2015

A MI FAMILIA

***“HIJA, QUÉ TUS TÍTULOS ACADÉMICOS NO SEAN NI EL INICIO NI EL FINAL DE NINGÚN
CAMINO, SIMPLEMENTE LA PRUEBA DE TU CAMINAR.”***

JUAN ESCRIBANO VALERO

GRACIAS PAPÁ

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, DONDE HE CONTADO CON LA COLABORACIÓN DE UN GRUPO DE PERSONAS A LAS QUE QUIERO DARLES LAS GRACIAS DE UNA FORMA ESPECIAL:

AL PROFESOR LUIS POLO, PORQUE ME HA ENSEÑADO MATERIAS QUE NO ESTÁN EN LOS LIBROS, PORQUE HA AGUANTADO ESTOICAMENTE MI TOZUDEZ, POR SU INESTIMABLE ENTREGA, POR SU INMENSA PACIENCIA. NO HAY SUSTITUTO PARA SU EXPERIENCIA Y ESTOY MUY AGRADECIDA PORQUE GENEROSAMENTE LA HA COMPARTIDO CONMIGO

“EL QUE SABE QUE NO SABE, ES SENCILLO; INSTRÚYELO. EL QUE NO SABE QUE SABE ESTÁ DORMIDO; DESPIÉRTALO. EL QUE SABE QUE SABE, ES SABIO; SÍGUELO”. POR TENER LA SUERTE DE PODER SEGUIR AL DR. NOUR KAYALI, POR SU DEDICACIÓN EN INSTRUIRME, POR SU DELICADEZA EN DESPERTARME; POR SU IMPAGABLE ENSEÑANZA, POR CONTAGIARME SU ENTUSIASMO, POR SIMPLIFICAR LAS COSAS, POR SU NATURALIDAD Y SU CERCANÍA, POR HABERLE CONOCIDO.

A MI COMPAÑERA CRISTINA GUTIÉRREZ; POR LA SERENIDAD QUE ME TRASMITE, POR LOS TIEMPOS DE CAFÉ COMPARTIDOS EN MOMENTOS CLAVES.

A MIS PADRES, QUE AUNQUE AHORA ESTÁN SEPARADOS FÍSICAMENTE NO CONOZCO A NADIE MÁS UNIDO QUE ELLOS. A MI MADRE, POR SU VALENTÍA Y SU FUERZA AUNQUE A VECES NO LO CREA. A MI PADRE, DONDE QUIERA QUE ESTÉS, NO HAY UN MINUTO QUE NO TE RECUERDE, SIENTO HABER TERMINADO TAN TARDE ESTE TRABAJO, SIENTO QUE HAYAS TENIDO QUE VERLO DESDE EL CIELO. GRACIAS POR TODO LO QUE ME HABÉIS DADO, SOIS EL MOTOR Y EJEMPLO DE LO QUE QUIERO EN LA VIDA.

A TODOS MIS HERMANOS, EN ESPECIAL A JUANJO Y EVA, POR TODO LO QUE ME HABÉIS AYUDADO EN LA PARTE DE MATEMÁTICAS Y BIOLOGÍA, POR TRANSFORMAR LO DIFÍCIL EN FÁCIL, POR DARME VUESTRO TIEMPO SACADO DE VUESTRO PROPIO DESCANSO. ¡GRACIAS DE TODO CORAZÓN!

A MI MARIDO, NOUR, NO ENCUENTRO PALABRAS PARA AGRADECER TODO LO QUE ME DAS GRATUITAMENTE, POR TUS OJOS, POR TU CORAZÓN Y POR TU MENTE, GRACIAS.

A MI HIJO NUR, QUE CON TRES AÑOS ES EL MOTOR DE CUANTO HAGO, POR TI TRABAJO, ESTUDIO Y NO DUERMO. TÚ ERES LA RAZÓN DE NO RENDIRME ANTE NADA-

CONTENIDO

CONTENIDO	1
Índice de tablas	7
Índice de figuras	9
Índice de cromatogramas TIC y espectros de masas (Anexo II)	18
Abreviaturas	21
Resumen	25
Summary	28
1. Introducción	33
1.1. Características generales del reino vegetal	34
1.1.1. Taxonomía	34
1.1.2. La reproducción de las plantas	37
1.2. El polen	42
1.2.1. Descripción y clasificación	43
1.2.2. Distribución en España	49
1.2.3. Distribución en la Comunidad Autónoma de Madrid	54
1.3. Sistema inmunológico ,	55
1.3.1. Mecanismos de defensa	58
1.3.2. Alérgenos	62
1.3.2.1. Tipos y clasificación	63
1.3.3. Respuesta alérgica	65
1.3.3.1. Hipersensibilidad de tipo I	66
1.3.3.2. Hipersensibilización de tipo II	69
1.3.3.3. Hipersensibilidad del tipo III	70
1.3.3.4. Hipersensibilidad del tipo IV	70
1.4. Antecedentes bibliográficos	70
1.4.1. Estudio del polen mediante técnicas cromatográficas	75
1.4.1.1. Introducción	75
1.4.1.2. Situación actual	76
1.4.2. Estudio del polen mediante microscopía electrónica	90
1.4.2.1. Introducción	90
1.4.2.2. Técnicas de microscopía electrónica	91
1.4.2.3. Situación actual	92
1.4.3. Polinosis y contaminación	98

2. Objetivo del trabajo	103
3. Parte experimental	107
3.1. Análisis mediante SPME-GCMS	108
3.1.1. Equipos y material	108
3.1.2. Reactivos	111
3.1.3. Muestras	111
3.1.3.1. Pólenes	111
3.1.3.2. Gases de combustión emitidos por vehículos	112
3.1.4. Procedimientos	112
3.1.4.1. Acondicionamiento de fibras SPME	112
3.1.4.2. Condiciones de análisis mediante GCMS	113
3.1.4.3. Análisis de pólenes	113
3.1.4.3.1. Preparación de la mezcla de VOCs para la semicuantificación (MIX-VOCs)	113
3.1.4.3.2. Preparación de muestras de polen	114
3.1.4.3.3. Preparación de muestras de polen enriquecidas para la semicuantificación de VOCs	114
3.1.4.3.4. Extracción mediante HS-SPME	115
3.1.4.3.5. Semicuantificación de VOCs	115
3.1.4.4. Análisis de gases de combustión	115
3.1.4.5. Identificación de VOCs	116
3.2. Análisis mediante microscopio SEM	116
3.2.1. Equipos, material y reactivos	116
3.2.2. Muestras	117
3.2.2.1. Polen	117
3.2.2.2. Partículas procedentes de vehículos	117
3.2.3. Procedimientos	117
3.2.3.1. Pólenes	117
3.2.3.2. Pólenes sometidos a 70°C	118
3.2.3.3. Pólenes tratados con disolvente orgánico	118
3.2.3.4. Partículas procedentes de vehículos	118
4. Resultados y Discusión	121
4.1. Análisis mediante SPME-GCMS	124
4.1.1. Optimización del método SPME-GCMS	124
4.1.1.1. Optimización del número de picos detectados	126
4.1.1.2. Optimización del área del tolueno	128
4.1.1.3. Optimización de condiciones de SPME	131
4.1.2. Determinación de VOCs	132
4.1.2.1. Resultados de semicuantificación	132
4.1.2.2. Polen	134

4.1.2.2.1.	Birch	135
4.1.2.2.2.	Grass	139
4.1.2.2.3.	Halapense	143
4.1.2.2.4.	Olmo	146
4.1.2.2.5.	Plátano	150
4.1.2.2.6.	Poa	153
4.1.2.2.7.	Quercus	157
4.1.2.2.8.	Fraxinus	161
4.1.2.2.9.	Olivo	164
4.1.2.2.10.	Populus	168
4.1.2.2.11.	Arizónica	172
4.1.3.	Estudio del comportamiento de las fibras en los pólenes	176
4.1.4.	VOCs procedentes de gases de combustión	181
4.1.4.1.	Selección de fibra de SPME	181
4.1.4.2.	Selección de la distancia recorrida	181
4.1.4.3.	Identificación de VOCs de los gases de combustión	183
4.2.	Análisis mediante microscopía electrónica SEM: morfología y microanálisis	195
4.2.1.	Polen	196
4.2.2.	Estudio del efecto de la temperatura sobre el polen	215
4.2.2.1.	Halapense	215
4.2.2.2.	Plátano	216
4.2.2.3.	Olivo	218
4.2.2.4.	Arizónica	219
4.2.3.	Estudio del efecto de un disolvente orgánico sobre el polen	219
4.2.3.1.	Halapense	220
4.2.3.2.	Plátano	220
4.2.3.3.	Olivo	221
4.2.3.4.	Arizónica	222
4.2.4.	Partículas procedentes de vehículos	224
4.2.4.1.	Vehículo V3 (diesel)	224
4.2.4.2.	Vehículo V4 (gasolina)	226
4.3.	Visión global de resultados	228
4.3.1.	Resultados del análisis de polen mediante SPME-GCMS	228
4.3.2.	VOCs de combustión y su presencia en pólenes	230
4.3.3.	Correlación entre resultados mediante SEM y SPME-GCMS	238
5.	Conclusiones	243
5.1.	Globales	243
5.2.	SPME-GCMS:	244
5.3.	SEM	244

6. ANEXO I: Identificación y semicuantificación de VOCs en pólenes mediante GCMS	249
7. ANEXO II: Cromatogramas TIC y espectros de masas obtenidos en el análisis de polen	313
8. ANEXO III: Procedencia de algunos VOCs presentes en el polen.	339
9. ANEXO IV: Divulgación científica	345
10. Referencias	365

ÍNDICES Y ABREVIATURAS

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de superficie del polen	46
Tabla 2. Ejemplos de enfermedades causadas por reacciones de hipersensibilidad frente a distintas categorías de antígenos.	66
Tabla 3. Alergias medidas por IgE (tipo I).....	69
Tabla 4. Tipos de cromatografía.....	76
Tabla 5. Estudio del polen mediante cromatografía de gases.	78
Tabla 6. Estudio del polen mediante cromatografía de líquidos	84
Tabla 7. Bibliografía de estudios de polen y microscopía electrónica	94
Tabla 8. GCMS	108
Tabla 9. Fibras SPME empeladas.....	110
Tabla 10. Mezcla de VOCs para semicuantificación.....	111
Tabla 11. Muestras de polen.....	111
Tabla 12. Vehículos.....	112
Tabla 13. Masas de las muestras de polen para análisis mediante HS-SPME-GCMS.	114
Tabla 14. Masas de las muestras enriquecidas con MIX VOCs para la cuantificación de VOCs en polen Sorghum Halapense	115
Tabla 15. Diseño experimental factorial para la optimización de parámetros de SPME.....	124
Tabla 16. Diseño experimental factorial y resultados obtenidos	125
Tabla 17. Resultados de condiciones óptimas para el número de picos detectados.....	126
Tabla 18. Resultados de condiciones óptimas para el área del tolueno	129
Tabla 19. Condiciones óptimas para SPME	132
Tabla 20. Resultados muestras enriquecidas.....	133
Tabla 21. Ejemplo de una tabla de datos para análisis PCA.....	138

Tabla 22. Identificación de VOCs procedente del vehículo V1 (WPolo de gasolina)	183
Tabla 23. Identificación de VOCs procedente del vehículo V2 (WPolo diesel)	185
Tabla 24. Identificación de VOCs del vehículo V3 (WPasat-diesel).....	185
Tabla 25. Identificación de VOCs del vehículo V4 (FFocus-gasolina).....	187
Tabla 26. Resultados obtenidos en SEM: Morfología y microanálisis	198
Tabla 27. Compuestos orgánicos identificados que son coincidentes en los pólenes analizados y los tubos de combustión de los vehículos estudiados ..	231
Tabla 28. Descripción morfológica de las partículas procedentes de los tubos de escape.....	239
Tabla 29. Resultados muestra de polen BIRCH	251
Tabla 30. Resultados de muestras de polen GRASS.....	258
Tabla 31. Resultados muestras de polen HALAPENSE	266
Tabla 32. Resultados muestras de polen OLMO	272
Tabla 33. Resultados muestras de polen PLÁTANO	276
Tabla 34. Resultados muestras polen POA	281
Tabla 35. Resultados muestra de polen QUERCUS	287
Tabla 36. Resultados de muestra de polen FRAXINIUS.....	292
Tabla 37. Resultados muestras de polen OLIVO	297
Tabla 38. Resultados muestras polen POPULUS	303
Tabla 39. Resultados muestras de polen ARIZÓNICA	308

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la taxonomía del Reino vegetal	36
Figura 2. Reproducción asexual en vegetales	38
Figura 3. Ciclo vital de briofitas y pteridofitas	40
Figura 4. Ciclo vital de gimnospermas y angiospermas	41
Figura 5. Estructura de un grano de polen: a) Esquema de una sección del grano; b) Fotografía de la pared del grano de polen de <i>Cuscuta</i> (Convolvulaceae) mediante microscopía electrónica de transmisión [].	44
Figura 6. Morfología y estructura del grano de polen.	49
Figura 7. Estaciones de muestreo de REA.....	50
Figura 8. Mapas de incidencia polínica para los pólenes más presentes en la atmósfera en España (2013)	53
Figura 9. Mapa de distribución de polen en la CAM el 13.02.2014	54
Figura 10. Histórico del polen total en la CAM desde 1994.....	55
Figura 11. Órganos del sistema inmune en la especie humana	57
Figura 12. Mecanismos innatos.....	58
Figura 13. Mecanismos adquiridos	60
Figura 14. Ejemplo de los diferentes mecanismos de defensa frente el ataque de un virus	61
Figura 15. Respuesta alérgica de tipo I: a) etapas de la respuesta alérgica, b) respuesta e implicación del sistema inmune	68
Figura 16. Publicaciones de polen desde el año 1985 hasta el año 2013 (WEB OF SCIENCE, consultado en abril de 2014)	71
Figura 17. Número de publicaciones científicas del polen en función del área de investigación (WEB OF SCIENCE, enero 1985 - abril 2014)	72
Figura 18. Número de publicaciones en cada área de investigación (WEB OF SCIENCE, 1985 - abril 2014).....	73

Figura 19. Número de publicaciones en el área de investigación de CC. Químicas (WEB OF SCIENCE, 1985 - abril 2014).....	73
Figura 20. Estudio porcentual de los tipos objetivos científicos en polen dentro del área de investigación de CC Químicas (WEB OF SCIENCE, consultado en abril 2014).....	74
Figura 21. Estudio porcentual de las distintas técnicas analíticas dentro del área de investigación de CC Químicas (WEB OF SCIENCE, consultado en abril 2014).....	75
Figura 22. Microscopía óptica y microscopía electrónica	92
Figura 23. Método ELISA directo e indirecto.	100
Figura 24. Estructuración del trabajo por técnicas utilizadas	107
Figura 25. Holder metálico de la fibra para tubos de combustión (Nurka)	109
Figura 26. Clasificación de compuestos orgánicos según su grupo funcional .	121
Figura 27. Prioridad de grupos funcionales	123
Figura 28. Gráfico de Pareto estandarizado para variable de respuesta "Número de picos detectados"	127
Figura 29. Efectos principales para variable de respuesta "Número de picos detectados"	127
Figura 30. Interacción entre factores en el número de picos detectados	128
Figura 31. Gráfico de superficie de respuesta para la variable "Número de picos detectados"	128
Figura 32. Gráfico de Pareto estandarizado para variable de respuesta "Área del tolueno"	129
Figura 33. Efectos principales para variable de respuesta "Área del tolueno".	130
Figura 34. Interacción entre factores en el área del tolueno.	130
Figura 35. Gráfico de superficie estimada para variable de respuesta "Número de picos detectados"	131

Figura 36. Cromatograma TIC del polen Halapense con 1 µL de la mezcla MIX-VOCS analizada con dos fibras: a) fibra azul clara; b) fibra blanca.	134
Figura 37. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (BIRCH)	136
Figura 38. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (BIRCH)	137
Figura 39. Resultados de estudio estadístico PCA (BIRCH)	139
Figura 40. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (GRASS).....	140
Figura 41. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (GRASS)	141
Figura 42. Resultados de estudio estadístico PCA (GRASS)	142
Figura 43. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (HALAPENSE)	144
Figura 44. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (HALAPENSE)	145
Figura 45. Resultados de estudio estadístico PCA (HALAPENSE).....	146
Figura 46. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (OLMO).....	148
Figura 47. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (OLMO)	149
Figura 48. Resultados de estudio estadístico PCA (OLMO).....	150
Figura 49. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (PLATANO)	151
Figura 50. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (PLÁTANO)	152
Figura 51. Resultados de estudio estadístico PCA (PLÁTANO)	153
Figura 52. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (POA).....	155
Figura 53. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (POA) ...	156
Figura 54. Resultados de estudio estadístico PCA (POA)	157
Figura 55. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (QUERCUS)	158
Figura 56. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (QUERCUS)	159

Figura 57. Resultados de estudio estadístico PCA (QUERCUS)	160
Figura 58. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (FRAXINIUS).....	162
Figura 59. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (FRAXINIUS)	163
Figura 60. Resultados de estudio estadístico PCA (FRAXINIUS).....	164
Figura 61. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (OLIVO).....	165
Figura 62. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (OLIVO)	167
Figura 63. Resultados de estudio estadístico PCA (OLIVO)	168
Figura 64. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (POPULUS).....	169
Figura 65. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (POPULUS)	170
Figura 66. Resultados de estudio estadístico PCA (POPULUS).....	171
Figura 67. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (ARIZÓNICA)	173
Figura 68. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (ARIZÓNICA)	174
Figura 69. Resultados de estudio estadístico PCA (ARIZÓNICA)	175
Figura 70. Clasificación de las fibras SPME según predomine el mecanismo de adsorción o absorción	179
Figura 71. Efecto de competitividad entre analitos: a) por concentración elevada de un compuesto; b) por número de compuestos.....	180
Figura 72. Cromatograma TIC del análisis de VOCs procedentes del vehículo V4 extraídos con fibra azul clara: a) recorrido 7 km; b) recorrido de 35 Km.....	182
Figura 73. Cromatograma TIC del vehículo V1 (WPolo gasolina).	188
Figura 74. Cromatograma TIC del vehículo V2 (WPolo diesel).	188
Figura 75. Cromatograma TIC del vehículo V3 (WPasat diesel).....	189
Figura 76. Cromatograma TIC del vehículo V4 (FFocus gasolina).	189
Figura 77. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V1 (WPolo-gasolina)	190

Figura 78. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V2 (WPolo-diesel)	191
Figura 79. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V3 (WPasat-diesel)	192
Figura 80. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V4.....	193
Figura 81. Comparación del tipo de compuestos detectados entre: a) vehículos de diesel; b) vehículos gasolina	194
Figura 82. BIRCH; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) y c) escala de 20 μm en distintas zonas; d) y e) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie.....	200
Figura 83. BIRCH; microanálisis.....	200
Figura 84. GRASS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) escala de 40,5 μm , donde se identifica las dimensiones de varios granos; c) y d) escala de 20 μm en distintas zonas; e) escala de 20 μm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 2 μm con la ornamentación en superficie.	201
Figura 85. GRASS; microanálisis	202
Figura 86. HALAPENSE; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental y alto vacío: a) escala de 100 μm ; b), d) y f) escala de 20 μm en distintas zonas; c), h) e i) escala 10 μm en distintas zonas; e) y g) escala de 5 μm en distintas zonas. En rojo se marcan las imperfecciones comentadas.	203
Figura 87. Microanálisis del polen HALAPENSE en la zona del grano sin anomalías (superficie general).	204
Figura 88. Microanálisis del polen HALAPENSE en las partículas exógena presente en algunos granos.	204
Figura 89. Microanálisis del polen HALAPENSE en una zona anómala.	205

Figura 90. OLMO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) escala de 50 μm ; c) y d) escala de 20 μm en distintas zonas; e) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie.	206
Figura 91. OLMO; microanálisis.....	206
Figura 92. PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) escala de 20 μm ; c) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; d) y e) escala de 2 μm donde se visualiza la ornamentación con detalle; f) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie.	207
Figura 93. PLÁTANO; microanálisis	207
Figura 94. POA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) escala de 20 μm en distintas zonas; c) y d) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; e) y f) escala de 2 μm con la ornamentación en superficie.	208
Figura 95. POA; microanálisis.....	208
Figura 96. QUERCUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) escala de 50 μm ; c) escala de 20 μm ; d) y e) escala de 10 μm en distintas zonas donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie.	209
Figura 97. QUERCUS; microanálisis.....	209
Figura 98. FRAXINIUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) y c) escala de 20 μm en distintas zonas; d) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; e) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie; f) escala de 2 μm	210

Figura 99. FRAXINIUS; microanálisis.	210
Figura 100. OLIVO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 20 μm (AMB); c) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen (AMB); d) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie (AMB); e) y f) escala de 5 μm con más resolución en la imagen (AV).	211
Figura 101. OLIVO; microanálisis.....	212
Figura 102. POPULUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 50 μm (AMB); c) escala de 2 μm donde se visualiza la ornamentación (AMB); d) y e) escala de 10 μm con la ornamentación en superficie con mayor nitidez (AV)	212
Figura 103 POPULUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío, escala de 2 μm con las medidas en altura de la ornamentación.	213
Figura 104 POPULUS; microanálisis.	213
Figura 105. ARIZÓNICA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 5 μm (AMB); c) escala de 20 μm donde se visualiza un único grano de polen (AMB); d) y e) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie (AMB); f) escala de 5 μm con más resolución en la imagen (AV).	214
Figura 106. ARIZÓNICA; microanálisis.....	215
Figura 107. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen HALAPENSE ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío.	216

Figura 108. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	217
Figura 109. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen OLIVO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	218
Figura 110. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen ARIZÓNICA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	219
Figura 111. Efecto de la acetona sobre el polen HALAPENSE ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	220
Figura 112. Efecto de la acetona sobre el polen PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	221
Figura 113. Efecto de la acetona sobre el polen OLIVO ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	222
Figura 114. Efecto de la acetona sobre el polen ARIZÓNICA ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío	223
Figura 115. Partículas del tubo de combustión del vehículo V3 (WPasat diesel) ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental.	225
Figura 116. Microanálisis de las partículas del del tubo de combustión del vehículo V3 (WPasat diesel) en distintas zonas, por tonalidades.....	226

Figura 117. Partículas del tubo de combustión del vehículo V4 (FFocus gasolina) ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental	227
Figura 118. Microanálisis de las partículas del del tubo de combustión del vehículo V4 (FFocus gasolina) en distintas zonas, por tonalidades.	227
Figura 119. Comparación del contenido porcentual de compuestos orgánicos volátiles clasificados según su grupo funcional entre los distintos pólenes estudiados.	229
Figura 120. Contenido porcentual del número de contaminantes en pólenes procedentes de los gases de combustión.	233
Figura 121. Concentraciones medias totales de contaminantes procedentes de gases de combustión en cada polen	234
Figura 122. Concentración media de contaminantes procedentes de vehículos de gasolina detectadas en los pólenes.....	236
Figura 123. Concentración media de contaminantes procedentes de vehículos de diésel detectadas en los pólenes.	237

Índice de cromatogramas TIC y espectros de masas (Anexo II)

CROMATOGRAMAS:

Cromatograma TIC 1. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra azul clara.....	317
Cromatograma TIC 2. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra violeta clara.....	317
Cromatograma TIC 3. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra roja.	318
Cromatograma TIC 4. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra azul clara.	318
Cromatograma TIC 5. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra violeta clara.....	319
Cromatograma TIC 6. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra roja.	319
Cromatograma TIC 7. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra azul clara.....	320
Cromatograma TIC 8. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra violeta clara. .	320
Cromatograma TIC 9. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra roja.....	321
Cromatograma TIC 10. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra azul clara.	321
Cromatograma TIC 11. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra violeta clara.	322
Cromatograma TIC 12. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra roja.	322
Cromatograma TIC 13. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra azul clara.	323
Cromatograma TIC 14. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra violeta clara....	323
Cromatograma TIC 15. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra roja.	324
Cromatograma TIC 16. Cromatograma TIC del polen POA, fibra azul clara.....	324
Cromatograma TIC 17. Cromatograma TIC del polen POA, fibra violeta clara.	325
Cromatograma TIC 18. Cromatograma TIC del polen POA, fibra roja.....	325
Cromatograma TIC 19. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra azul clara.	326
Cromatograma TIC 20. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra violeta clara. ..	326
Cromatograma TIC 21. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra roja.....	327
Cromatograma TIC 22. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra azul clara.	327
Cromatograma TIC 23. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra violeta clara. .	328
Cromatograma TIC 24. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra roja.	328
Cromatograma TIC 25. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra azul clara.....	329
Cromatograma TIC 26. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra violeta clara.	329
Cromatograma TIC 27. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra roja.	330

Cromatograma TIC 28. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra azul clara.	330
Cromatograma TIC 29. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra violeta clara. ...	331
Cromatograma TIC 30. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra roja.	331
Cromatograma TIC 31. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra azul clara.	332
Cromatograma TIC 32. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra violeta clara. ...	332
Cromatograma TIC 33. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra roja.	333

ESPECTROS DE MASAS:

Espectro de masas 1. BIRCH, fibra azul clara, pico cromatográfico a 23,264 minutos, identificado como ácido acético.	334
Espectro de masas 2. GRASS, fibra gris, pico cromatográfico a 38,631 minutos identificado como dimetilsulfóxido.	334
Espectro de masas 3. HALAPENSE, fibra roja, pico cromatográfico a 32,648 minutos identificado como tetracloroetileno.	335
Espectro de masas 4. HALAPENSE, fibra azul claro, pico cromatográfico a 51.965 minutos identificado como 1-metil-naftaleno.	335
Espectro de masas 5. HALAPENSE, fibra azul claro, pico cromatográfico a 52.360 minutos identificado como 2-metil-naftaleno.	336
Espectro de masas 6. PLÁTANO, fibra verde-amarilla, pico cromatográfico a 52.742 minutos identificados como 1-metil-2(2-metilpropil)-hidracina.	336
Espectro de masas 7. POA, fibra blanca, pico cromatográfico a 53.051 minutos identificado como 1-metil, 2,4-diisocianato-benceno.	337
Espectro de masas 8. FRAXINIUS, fibra rosa, pico cromatográfico a 30.425 minutos identificado como tolueno.	337
Espectro de masas 9. FRAXINIUS, fibra roja, pico cromatográfico a 53.792 minutos identificado como isobutil-octil ftalato.	338
Espectro de masas 10. ARIZÓNICA, fibra verde, pico cromatográfico a 53.102 minutos identificado como tridecano.	338

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
• aa	Aminoácido
• ACN	Acetonitrilo
• ADN	Ácido desoxirribonucleico
• AEA	Asociación Española de Aerobiología
• ARN	Ácido ribonucleico
• BTEX	Benceno-Tolueno-Etilbenceno-Xileno
• CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
• CAR	Carboxen
• CAT	Centro de Asistencia Tecnológica de Microscopía
• CC	Concentración
• CPA	Células Presentadoras de Antígeno
• CW	Carbowax
• DAD	Diodo Array Detector
• DCM:HX	Mezcla de diclorometano y hexano
• DVB	Divenilbenceno
• ECD	Electron capture detector
• EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
• ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas')
• EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
• Extracción S-L	Exstracción sólido-líquido
• FID	Detector de ionización de llama
• GC	Cromatografía de gases
• HC	Hidrocarburos
• HDPE	Polietileno de alta densidad
• HFCS	Jarabe de maíz de alta fructosa (High fructose corn syrup)
• HPLC	Cromatografía de líquidos
• HS-SPME	Solid Phase Microextraction
• Ig	Inmonoglobulinas E (anticuerpos)
• IL	Interleucinas
• MeOH	Metanol

Abreviatura	Descripción
• MIX-VOCs	Mezcla de VOCs
• MS	Mass Spectroemeter
• MSPD	Matrix solid phase dispersion
• N.D.	No detectado
• NK	Células asesinas ("Natural Killer")
• OCP	Pesticidas organoclorados
• OPP	Pesticidas organofosforados
• PA	Poliacrilato
• PAHs	Hidrocarburo aromático policíclico
• PAs	Alcaloides pirrolizidónicos
• PCA	Análisis de Componentes Principales
• PDMS	Polidimetilsiloxano
• PEG	Polietilen glicol
• PRF-1	Perforina
• PTFE	Politetrafluoroetileno
• QuEChERS	Método de extracción: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
• REA	Red Española de Aerobiología
• rpm	Revoluciones por minuto
• SEM	Microscopia electrónica de barrido
• SPE	Solid Phase Extraction
• TEM	Microscopía electrónica de transmisión
• Th	Linfocito T
• TOF-MS	Detector de masas de tubo de vuelo
• t_R	Tiempo de retención
• u.a.	Unidad de área
• UE	Unión Europea
• USE	Extracción con ultrasonidos
• UV-vis	Detector ultravioleta-visible
• VOCs	Compuestos orgánicos volátiles

RESUMEN & SUMMARY

Resumen

El grano de polen es el gameto masculino de la subdivisión Espermatofitas (plantas con semillas) que está formado por una doble membrana. En función de la estrategia de fecundación de la planta espermatofita y, por tanto, de dispersión del polen, se pueden distinguir dos tipos: a) polen anemófilo, generado por flores poco llamativas, ligero, volátil y encontrado a grandes distancias por acción del viento y b) polen entomófilo, generado por flores llamativas que desprende ciertos VOCs biológicamente activos para ciertos insectos, pegajoso y pesado. En principio, el polen más abundante en la atmósfera es el anemófilo, a excepción del polen del olivo, el cual es entomófilo pero al generarse en grandes cantidades participa de ambas estrategias de dispersión.

Aunque el polen puede considerarse una biopartícula inocua para la salud, existe una gran proporción de individuos que desarrollan una respuesta inmune adaptativa frente a sustancias inofensivas para el organismo, como el polen. Este tipo de respuestas inmunes frente a sustancias extrañas no infecciosas puede producir una patología clínica que se conoce como reacción alérgica, reacción de hipersensibilidad o simplemente alergia, y concretamente en el polen, hipersensibilidad del tipo I, donde actúan los anticuerpos IgE y la respuesta es prácticamente inmediata.

En las últimas décadas se ha observado un incremento de episodios alérgicos en la población. Este hecho ha sido investigado ampliamente llegando a la conclusión de que la contaminación, y en concreto, la producida por la combustión del carburante diesel en motores de explosión y combustión interna, produce un efecto sinérgico, sensibilizando el sistema inmune. En los años 2000 y sucesivos, se demostró mediante estudios inmunológicos, como por ejemplo aplicando el método ELISA, que la concentración del anticuerpo IgE es mayor en presencia del conjunto (polen – partícula de diesel) que con alérgeno de polen exclusivamente. En el mismo sentido, otros estudios de tipo estadístico ponen en evidencia el aumento de sintomatología clínica de hipersensibilidad de tipo I en ambientes contaminados, como por ejemplo en hogares con fumadores, o con la presencia de otros alérgenos distintos al polen, como por ejemplo mascotas o en hogares con humedades relativas elevadas (siendo especialmente importante en alergias a los ácaros).

En este trabajo se plantea la posibilidad de que el aumento de episodios alérgicos pueda contribuir, además de por las razones inmunológicas demostradas y comentadas anteriormente, porque el grano de polen actúe como una partícula tóxica, pre-concentrando contaminantes del entorno en su superficie. En consecuencia, la respuesta del sistema inmune dejaría de ser una reacción exagerada ante una partícula inofensiva y pasaría a ser una respuesta del sistema inmune ante una partícula que contiene compuestos y/o partículas tóxicas procedentes de la contaminación ambiental. Este fenómeno sería más acusado en periodos de polinización.

Por tanto, en el trabajo presentado se ha estudiado el polen en su doble vertiente, como partículas pre-concentradoras de compuestos volátiles contaminantes y como portadores de partículas sólidas contaminantes adheridas en su superficie. Para tal fin, se han seleccionado 11 pólenes, 8 de los cuales son los más abundantes en la atmósfera de la Comunidad Autónoma de Madrid, aplicándose los siguientes procedimientos analíticos:

1. Mediante HS-SPME-GCMS:

- a. Para la identificación y semi-cuantificación de VOCs presentes en el polen, distinguiendo los compuestos exógenos. Con el fin de identificar todo tipo de compuestos presentes en los pólenes, se han empleado diversas fibras disponibles en el mercado.
- b. Para la identificación de los VOCs emitidos por los tubos de combustión de vehículos en movimiento que consumen carburantes tanto de diesel como gasolina, utilizando la fibra azul clara y un soporte acoplado a los tubos de combustión de diferentes vehículos.

2. Mediante SEM:

- a. Para la determinación morfológica de las partículas procedentes de los tubos de combustión de los vehículos estudiados.
- b. Para detectar la presencia de partículas exógenas en muestras de polen en el margen (500µm-200nm).

La técnica SPME-GCMS ha permitido detectar VOCs procedentes del tubo de combustión en algunos pólenes, tales como el 1-naftaleno o el 2-naftaleno, algunos BTEX como el tolueno o etilbenceno, así como numerosos hidrocarburos tales como el tetradecano o el dodecano. Como ejemplo, el

polen de Arizónica contiene más de un 17 % de hidrocarburos saturados, la mayoría de los cuales puede ser relacionada con los gases de combustión emitidos por los vehículos. Por otra parte, se han detectado contaminantes de diferente procedencia, como el tetracloroetileno en el polen Halapense; dicho compuesto está relacionado con la industria textil.

Como objetivo transversal, se ha podido estudiar mediante análisis de componentes principales, el comportamiento de las fibras en función de la naturaleza y contenido de VOCs presentes en las muestras de polen, observándose que las diferencias de comportamiento pueden estar causadas por efecto de competitividad de los analitos por la fibra. Se puede concluir que la fibra azul clara es la más versátil y la que retiene mayores cantidades de VOCs. Para la optimización del procedimiento de SPME se ha empleado la herramienta estadística de diseño experimental factorial, con la utilización de un pequeño número de ensayos analíticos.

Mediante SEM no se ha detectado la presencia de partículas procedentes de los tubos de combustión del vehículo, aunque en el caso del polen Halapense, sí se han observado la presencia de partículas exógenas con contenidos elevados de calcio cuya procedencia no se ha podido establecer.

Por último, se estudiaron los posibles cambios de la exina producidos a las condiciones de temperatura de SPME aplicadas, realizando el análisis mediante SEM de 4 pólenes sometidos a una temperatura de 70°C durante 1 hora (mismas condiciones que en SPME). Los resultados obtenidos en estos experimentos concluyeron que las condiciones de temperatura no modificaron la estructura de la superficie del polen; en consecuencia los VOCs detectados se encuentran en la superficie del polen.

En resumen, las partículas de polen son de tamaño variado, por lo general, menor a 50 μm , que contienen en superficie compuestos volátiles contaminantes, pudiéndose considerar como una partícula pre-concentradora de compuestos tóxicos, pudiéndose considerar como un marcador medioambiental

Summary

Inside the pollen grain of spermatophyte plants there are double membranes where male gametes are formed. Depending on the manner of plant fecundation, and consequently pollen dispersion, two pollen types can be distinguished: a) anemophilous pollen, which is generated by unattractive flowers; it is light and volatile and it can be found far away from its source carried by air currents b) entomophilous pollen, which is generated by attractive flowers; it produces biological VOCs which are heavy and sticky and attractive to certain types of insects. In general terms, anemophilous pollen is more abundant in the atmosphere with the exception of the entomophilous pollen of the olive tree, which is produced in huge amounts.

Although pollen can be considered as an innocuous bio-particle for human health, a lot of people have developed an adaptive immune response. This fast response to non infectious exogenous compounds is known as an allergic disease or Type I hypersensitivity, causing IgE antibodies to develop.

Over the last few decades an increase in allergic episodes has been detected in the human population. This fact has been widely studied, the conclusion being that pollution and air particles produced by diesel engines give rise to a synergic effect, sensitizing the immune system. At the beginning of 21st century, immunologic studies using the ELISA technique showed that IgE antibody concentration is higher in the presence of pollen-diesel particle mixtures than in the presence of pollen alone. In the same way, other statistical studies have showed an increase in Type I hypersensitivity in polluted environments, such as in the houses of smokers or in houses with high humidity as well as in the presence of allergens other than pollen, including pet allergens, and especially mite allergens.

In this work, pollen capacity to retain and to concentrate pollutant compounds as well as atmospheric particles is studied. An attempt has been made to establish correlations between VOC content in pollens and compounds produced by diesel vehicle engines.

Eleven pollens have been selected, eight of which are found most often in the CAM atmosphere. The following analytical procedures have been applied:

1. Head space solid phase micro-extraction (HS-SPME):
 - a. This technique has been used to semi-quantify VOCs in pollen and to distinguish between endogenous and exogenous compounds. In order to make a complete screening to identify compounds in pollen all of the commercial fibers available have been tested.
 - b. A blue-light fiber has been coupled to the exhaust of different vehicles for the identification of VOCs produced by both gasoline and diesel vehicle engines in movement.
2. Scanning electron microscopy (SEM):
 - a. It has been used to determine the morphology of particles which come from the exhaust pipes of different vehicles.
 - b. Exogenous pollen particles detected in the range (200nm-500µm) have been studied using this technique.

Regarding the results, GCMS has allowed the detection of VOCs, produced by combustions engines, in several pollens; these VOCs included 1-naphtalene, several BTEX, such as toluene or ethylbenecene, as well as many hydrocarbons, mainly tetradecane and dodecane. For example, Arizona pine pollen contains 18% of saturated hydrocarbons, most of which can be related to combustion gases emitted by vehicle engines. Moreover, pollutants from other sources have been detected; for example, tetrachloroethylene in Halepense pollen, which is related to the textile industry.

As a secondary objective, principal component analysis of the results has allowed fiber behaviours to be studied as a function of both nature and VOC content present in pollen; behaviour differences may be attributed to a competitive VOC effect on the fiber. Blue-light fiber was the most versatile and the one that retained higher VOC amounts. Optimization of the SPME method has been carried out by experimental factorial design using a small number of analytical assays.

The SEM technique, also used in this work, is able to detect particles higher than 200 nm. Exogenous particles have been detected only in Halepense pollen, although its high calcium content indicates that it does not come from engine combustion, its source remaining unknown at the present time.

Finally, possible changes in exine pollen were studied by SEM in order to establish whether detected VOCs are present on the pollen surface. Four pollens were heated in accordance with SPME working conditions (at 70°C for 1 hour) and the results indicated that this temperature did not change exine pollen. Consequently, the VOCs which are detected are only present on the surface of the pollen.

In summary, pollen particles concentrate volatile pollutants on their surface and may be considered as toxic particles and environmental markers.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Como es sabido, no todas las plantas generan polen, porque no todas se reproducen por la misma vía. Por otra parte, todo tipo de polen generado por esas plantas concretas no es considerado como polen alergénico, sino que en función de la estrategia de fecundación, se distinguen dos tipos de plantas¹:

- Plantas entomófilas: cuyo polen es pesado, pegajoso, las flores generadoras son llamativas y desprenden VOCs biológicamente activos para determinados insectos. La estrategia de fecundación está basada en el transporte del polen mediante insectos, donde el polen queda adherido en su cuerpo y es depositado en otra flor. Por lo general, su polen no es considerado como alergénico por no encontrarse en grandes concentraciones en la atmósfera.
- Plantas anemófilas: cuyo polen es ligero, volátil, las flores generadoras no son muy llamativas. La estrategia de fecundación está basada en la dispersión del polen a grandes distancias mediante el viento. Su polen es considerado como alergénico, por estar disperso en la atmósfera a altas concentraciones en los periodos de polinización.

Cabe destacar que las plantas pueden seguir ambas estrategias de fecundación, por ejemplo, el olivo. La polinización del olivo es entomófila, pero también es anemófila cuando la producción de polen es abundante^{2,3}. Por tanto, para poder centrar el tipo de muestras de interés para alcanzar el objetivo de esta investigación, es necesario tener en cuenta ciertos aspectos básicos de taxonomía, reproducción vegetal y otros conocimientos generales de la Biología que se detallan en esta sección.

1.1. Características generales del reino vegetal

1.1.1. Taxonomía

La taxonomía, del griego $\tau\alpha\chi\iota\varsigma$ /taxis/, “ordenamiento”, y $\nu\omicron\mu\omicron\varsigma$ /nomos/, “norma” o “regla”, es la ciencia de la clasificación de los seres vivos. El criterio actual aceptado como base de la taxonomía es el que refleja la filogenia de los seres vivos y que tiene en cuenta la comparación de los caracteres morfológicos, anatómicos, citogenéticos, etc. La **taxonomía clásica** es la universalmente aceptada: agrupa los seres vivos en función de determinadas características comunes y hereditarias.

Cada sistema construido según las leyes de la lógica, corresponde a la necesidad del ser humano de clasificar, para poder alcanzar una inspección del conjunto. La agrupación sistemática de las plantas puede emprenderse conforme a diferentes puntos de vista y proponiendo diversos fines. En la práctica, se han ideado muchos sistemas, en el caso concreto de los vegetales, cabe destacar:

- Sistemas artificiales: utilizan caracteres arbitrariamente elegidos para la distinción de las divisiones y subdivisiones.
- Sistemas naturales: llamadas también “métodos”, parten del supuesto de que en la actualidad, las plantas tienen un origen común y han evolucionado en diferentes direcciones, teniendo una relación de parentesco. Este parentesco es el que rige en la agrupación metódica para la clasificación, llamado parentesco natural. Para descubrir el grado de parentesco natural, la paleontología del Reino vegetal nos da puntos de apoyo esenciales, sobre todo en la escasez y los vacíos del material utilizable que se encuentran habitualmente.

La botánica descriptiva o sistemática tiene por objeto la descripción científica, la nomenclatura de las especies vegetales y su ordenación en un sistema. En la actualidad los principales criterios que se siguen en la clasificación del mundo vegetal, son las características de la estructura interna de las plantas y de sus ciclos biológicos. El taxón inferior del Reino Vegetal es la **especie**; se entiende por especie al conjunto de individuos que concuerdan en todos sus caracteres esenciales y no se pueden separar más que por los no

esenciales o por los descendientes de un mismo individuo. Una agrupación de especies que presentan características análogas constituye el **género**; a su vez, los géneros se reúnen en **familias** en base a la existencia de algunas diferencias estructurales; por su parte, un conjunto de familias relacionadas entre sí se agrupan en un **orden**; igualmente, varios órdenes constituyen las **clases**; éstas se integran en **divisiones**, y finalmente todo el conjunto forma el **reino vegetal**. Además, se admiten otras categorías intermedias como son subclase, superorden, etc.

En la figura 1 se presenta la taxonomía del reino vegetal esquematizada, indicando las características de estructura interna y/o los ciclos biológicos que dan lugar a dicha clasificación.

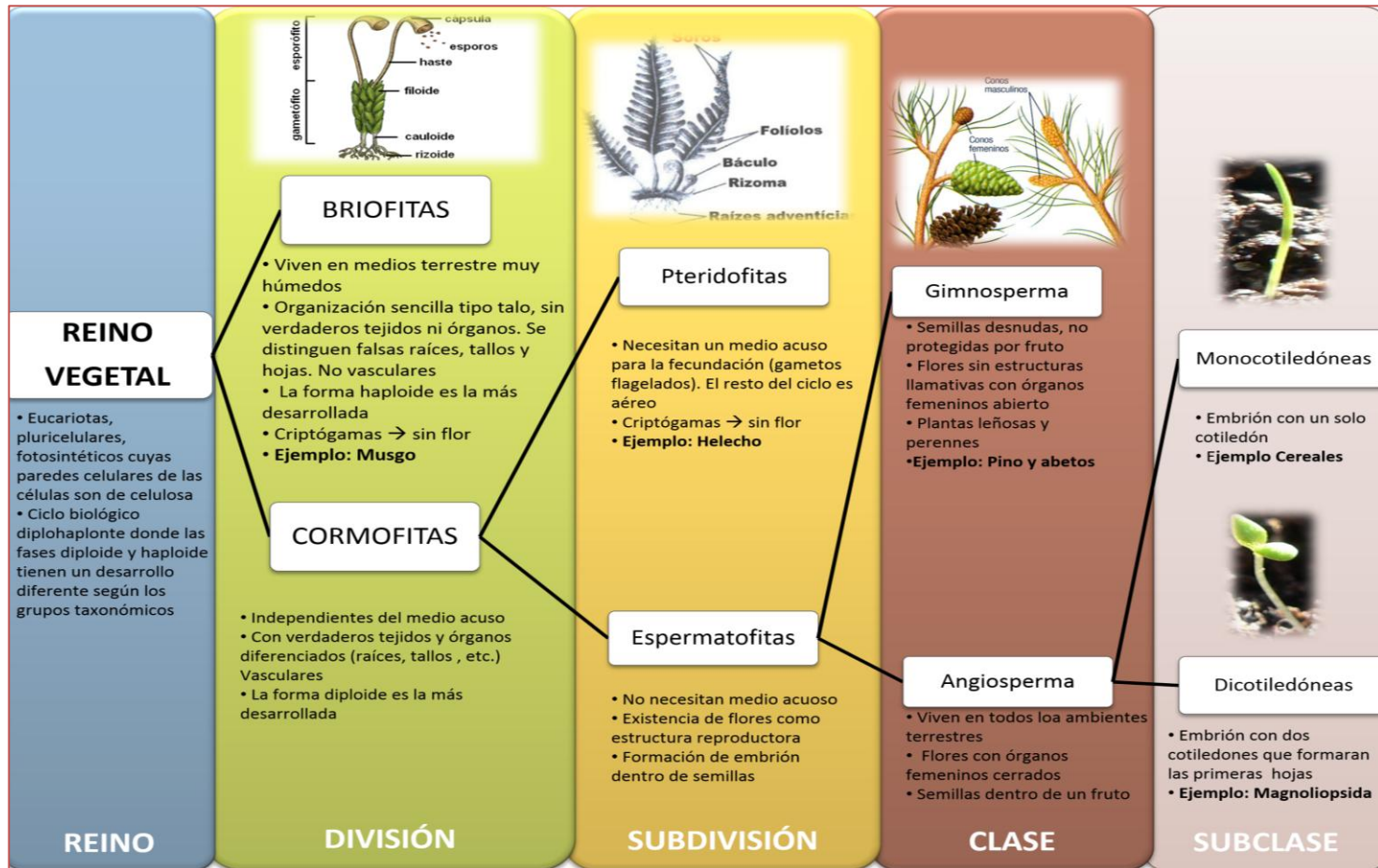


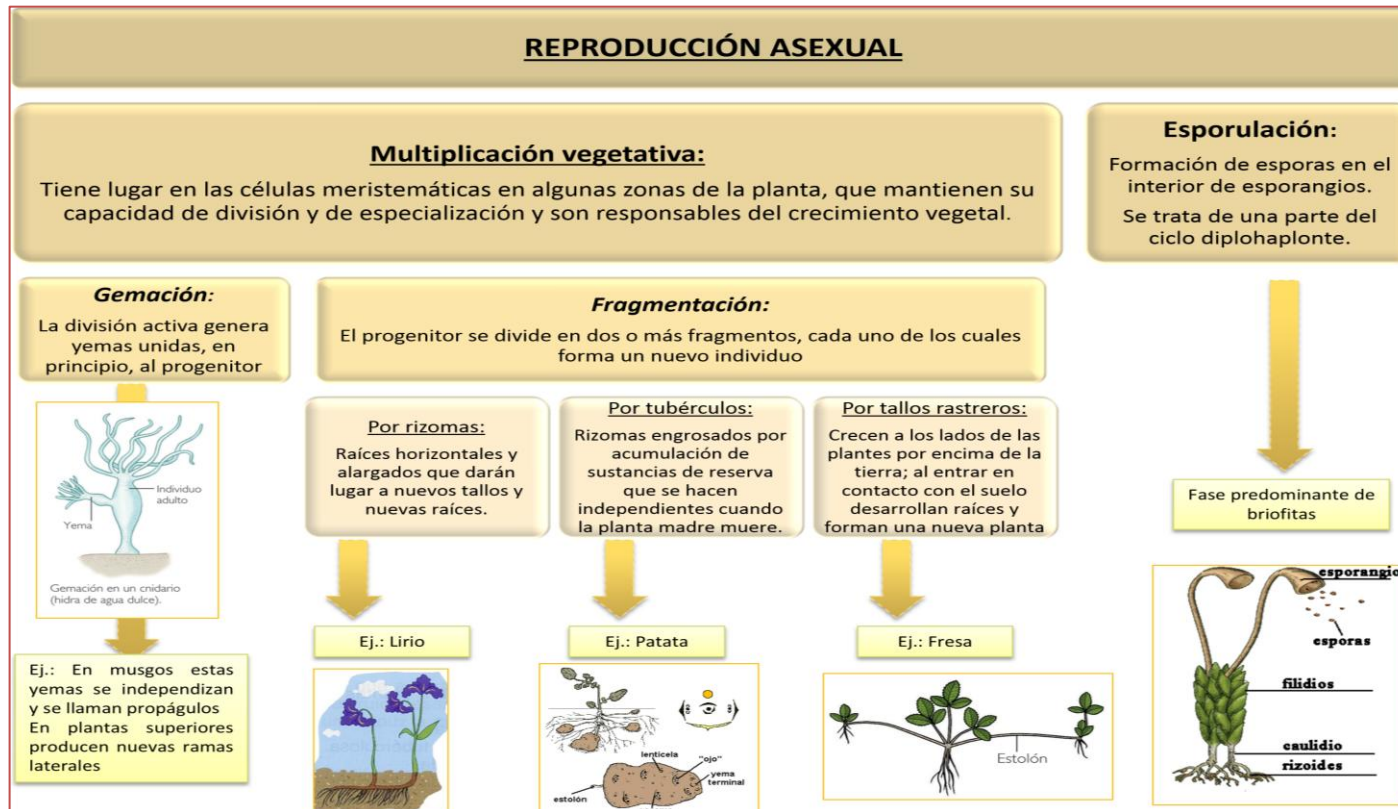
Figura 1. Esquema de la taxonomía del Reino vegetal

1.1.2. La reproducción de las plantas

Los musgos, los helechos y las plantas con semillas presentan un ciclo **diplohaplonte** con alternancia de fases o generaciones. Así existen individuos haploides (fase gametofítica) y otros diploides (fase esporofítica). La meiosis se produce al formarse las esporas y éstas dan lugar a un adulto haploide llamado gametofito, en el que se forman los gametos haploides. Tras la fecundación se produce un cigoto diploide que origina una nueva fase esporofítica. No obstante, a medida que se avanza en la evolución, la fase diploide va adquiriendo más importancia sobre la fase haploide, hasta llegar a las espermatofitas, en las cuales su gametofito haploide sólo es observable mediante microscopio y el esporofito diploide es la planta visible

a) Reproducción asexual

Las nuevas plantas se forman a partir de una o varias células de un mismo progenitor. No existe intercambio genético, característica principal del proceso reproductivo sexual, y, en ausencia de mutaciones, las nuevas plantas tienen características idénticas a las del progenitor. La principal ventaja es la rapidez del proceso y el gran número de descendientes que se producen. Sin embargo, como principal inconveniente destaca la variabilidad genética prácticamente nula, donde por ejemplo, cualquier cambio ambiental negativo podría provocar la muerte de todos los individuos. En la figura 2 se muestran los tipos de reproducción asexual para los vegetales y sus principales características.



b) Reproducción sexual

Las plantas hijas se forman a partir de dos células especializadas haploides (gametos con n cromosomas) que se fusionan en la fecundación para producir una célula huevo o cigoto, cuyo desarrollo posterior da lugar a la nueva planta. Los gametos se originan en unos órganos llamados gametangios y pueden ser:

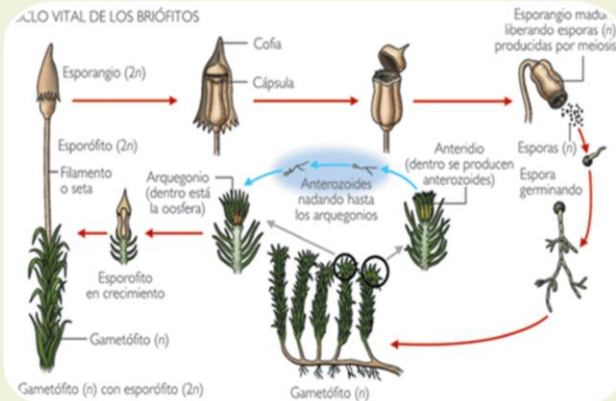
- ¹Arquegonios: Se forman los gametos femeninos u ooesferas, que son grandes e inmóviles. El paso del medio acuático al terrestre supuso el desarrollo del arquegonio protegiendo al óvulo y evitando su desecación.
- ¹Anteridios: Se forman los gametos masculinos o anterozoides, que en las formas más primitivas son flagelados y siguen dependiendo del agua. En formas más evolucionadas, los gametos masculinos se rodean de cubiertas protectoras y forman el grano de polen, aumentando su protección.

La principal ventaja de la reproducción sexual radica en la variabilidad genética en las poblaciones. Mientras que el inconveniente destacado sería el reducido número de descendientes, causado por la dificultad en el encuentro necesario de ambos gametos.

Como se ha mencionado en el apartado 1.1.1, la división de las plantas en distintos taxones depende de la morfología, ciclos biológicos, etc. que tienen en común. Por tanto, la clasificación también vendrá determinada por estos ciclos biológicos. En la figura 3 se detallan los ciclos vitales de las Briofitas y Pteridofitas y en la figura 4 se representan los de las Espermatofitas.

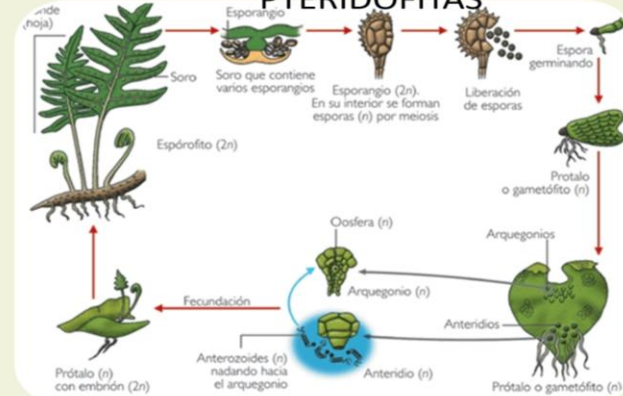
¹ En las Espermatofitas, el anteridio se denomina androceo y el arquegonio se denomina gineceo.

BRIOFOTAS



- Predominio del gametofito (haploide)
- La planga visible constituye el gametofito (n), en el que originan los **arquegonios**, con sólo una oosfera, y los **anteridios** donde se forman los anterozoides biflagelados haploides.
- En la **fecundación** se rompe el anteridio y los anterozoides se desplazan por el agua hasta llegar al arquegonio; uno de ellos penetra y fecunda la oosfera. Se forma el cigoto (2n) que se desarrolla en la planta dando lugar al **esporofito** (2n).
- En el esporofito se generan mediante meiosis las esporas (n), que al germinar, darán lugar a nuevos esporofitos haploides

PTERIDOFITAS

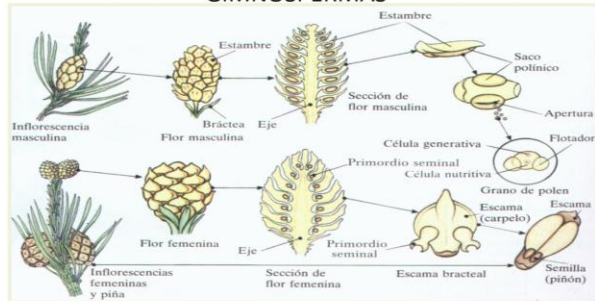


- Predominio del esporofito (2n)
- La planta visible es el esporofito y en el envés de sus hojas se forman los **soros**, que son un conjunto de esporangios donde se forman las esporas mediante meiosis.
- Las esporas al germinar dan lugar a una pequeña planta llamada **prótalo**, que es el gametofito, donde se desarrollan los arquegonios, productores de oosferas, y los anteridios, productores de anterozoides flagelados haploides. Los anterozoides se desplazan por el agua hasta llegar al arquegonio.
- Se produce la fecundación formándose el cigoto, que da lugar a un nuevo esporofito (2n)

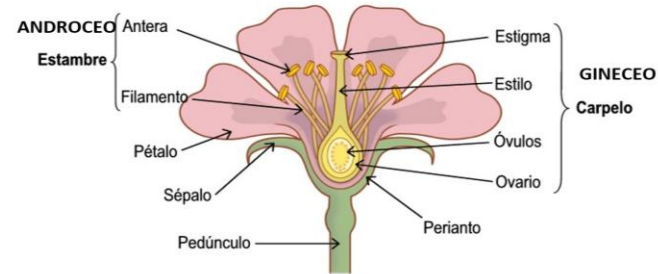
Figura 3. Ciclo vital de briofitas y pteridofitas

ESPERMATOFITAS:

Predomina del esporofito ($2n$), quedando el gametofito (n) reducido a una estructura llamada **saco embrionario** y al **grano de polen**. Su ciclo vital es completamente independiente del agua y para realizar la fecundación desarrollan lo que se conoce con el nombre de **tubo polínico**. El órgano reproductor es la flor, diferente en función de la clase en la que se encuentre.

GYMNASPERMAS

- Las flores son unisexuales.
- Las flores masculinas están compuestas por un tipo de anteridio llamado **androceo**, constituido por **estambres** que se agrupan en conos. En la base de los estambres hay dos **sacos polínicos** en cuyo interior se encuentran los **granos de polen**.
- Las flores femeninas están constituidas por un tipo de arqueogonio llamado **gineceo** y se reúnen en grupos formando **piñas**, que constan de un eje central alrededor del cual se disponen varias **brácteas**. Los óvulos quedan al descubierto.
- Mediante la **polinización por el viento (anemófila)**, el grano de polen llega al óvulo donde genera un corto tubo polínico, e introduce en el óvulo los dos núcleos espermáticos; uno de ellos fecunda el óvulo y el otro degenera (**fecundación simple**). A la vez que se desarrolla el embrión por mitosis, lo hace el **endospermo** que le servirá de alimento.

ANGIOSPERMAS

© Classe Qsl - www.enciclopediasalud.com - V.Barceló

- Las flores tienen aparato reproductor femenino (**gineceo**) y aparato reproductor masculino (**androceo**).
- En la **fecundación**, el polen sale por dehiscencia de las anteras, y llega al estigma por el viento (**anemófila**) o por medio de los insectos (**entomófilas**).
- Una vez en el estigma, la membrana exterior del polen (exina) se rompe y la membrana interior del polen (intina) se alarga formando el tubo polínico. Los dos núcleos espermáticos realizan una doble función: Uno fecunda a la oosfera dando lugar al cigoto diploide y el otro fusiona con el núcleo secundario originando un núcleo triploide ($3n$) que generará por mitosis, el endospermo o albumen (reserva alimenticia del embrión).

Figura 4. Ciclo vital de gimnospermas y angiospermas

La conclusión inmediata que se obtiene de ambas figuras es que los vegetales que se reproducen mediante polen son las Espermatofitas. Por otra parte, la fecundación anemófila corresponde a las gimnospermas y algunas de las angiospermas, mientras que la fecundación entomófila sólo se da en algunas de las angiospermas, en función del tipo de flor y polen, según se ha descrito en el apartado de Introducción.

En el presente trabajo, la investigación se centrará casi exclusivamente en plantas cuya fecundación es de naturaleza anemófila, por considerarse polen alergénico al encontrarse disperso en la atmósfera a elevadas concentraciones en épocas de polinización.

1.2. El polen

Como ya se ha mencionado, el grano de polen es el gameto masculino y está rodeado por una compleja pared externa. Una vez que el polen ha sido liberado, los granos se pueden activar al absorber agua a través de las aperturas o perforaciones, e inmediatamente las proteínas hidrosolubles salen al exterior. Esta activación está relacionada con la reacción de reconocimiento polen-estigma, pero puede ser provocada por distintos medios (atmósfera, mucosas...). Mediante el proceso de la activación, entran en contacto los factores de reconocimiento del polen y del stigma, determinando si un grano de polen germinará o no.

Aproximadamente las dos terceras partes de las familias de Angiospermas presentan fenómenos de auto-incompatibilidad. Por ejemplo, un grano de polen puede germinar, pero el crecimiento se puede detener en la superficie estigmática, o a veces, en el interior del estilo, si no se reconoce su compatibilidad.

La diversidad en cuanto a forma y estructura de los granos de polen sugiere, que los diferentes tipos han surgido a partir de un extraordinario proceso de adaptación.

1.2.1. Descripción y clasificación

Un grano de polen está constituido por dos partes: “la célula viva” y la “esporodermis” o pared externa. La función primaria de la pared del polen es la protección del protoplasma celular, mediante la impermeabilización y la resistencia a la degradación físico-química y biológica. La naturaleza de la misma proporciona multitud de caracteres importantes en filogenia y para su estudio hay que tener en cuenta su “estratificación” y su “ornamentación”. La esporodermis está formada por varios **estratos** que difieren por sus caracteres químicos, morfológicos y ontogénicos. Consta fundamentalmente de dos capas muy diferenciadas:

- La exina es la capa más externa que rodea a todo el conjunto y más resistente de la pared del grano de polen. Su resistencia a la destrucción es una de las mayores del reino vegetal, ya que soporta la acción de los ácidos y bases concentradas, así como el calentamiento hasta 300°C, siendo únicamente alterada por algunos oxidantes y por ciertos microorganismos. Debido a ello, se han encontrado exinas prácticamente intactas en predecesores de los granos de polen actuales, como esporas de helechos y prepólenes, procedentes de depósitos del Paleozoico.

La exina es una capa que presenta una cierta elasticidad y plasticidad, permitiendo al grano de polen adaptarse a las condiciones ambientales.

Su componente químico fundamental es la esporopolenina, que se forma por la polimerización de carotenos y ésteres de carotenos oxidados en proporciones variables.

Hay también un componente polisacárido y otro lipídico, así como proteínas, fundamentalmente glicoproteínas.

La exina consta a su vez de dos capas: ectexina (externa) y endexina (interna). Ambas, se diferencian por su morfología, por su desarrollo y por su composición química. Esta diferencia se puede observar a microscopio óptico utilizando tinciones diferenciales y a microscopio electrónico de transmisión, ya que ambas capas dan distinto contraste. La ectexina, por lo general presenta una disposición radial de sus elementos. En los casos más simples consta de dos estratos: téctum e infratéctum. El infratéctum puede estar o no, apoyado

sobre la denominada capa basal o foot layer. Sobre el téctum pueden existir una serie de elementos esculturales o relieve, que constituyen la ornamentación del polen. La endexina es la capa más interna de la exina, suele ser más o menos lisa u homogénea, engrosándose alrededor de las aperturas. En el proceso de formación de la exina, la endexina se desarrolla después de la ectexina. Puede estar atravesada por poros o canales; tener una estructura lamelar y variar de morfología cerca de las aperturas. Su papel es muy importante en la flexibilidad del grano de polen y para facilitar la salida del tubo polínico en el momento de la fecundación. Entre las capas de ectexina y endexina, existen una serie de microtúbulos o canalículos que las atraviesan, a través de las cuales se produce el intercambio de sustancias, es decir, hay cierta permeabilidad con la célula polínica. En la figura 5 se muestra la estructura del polen.

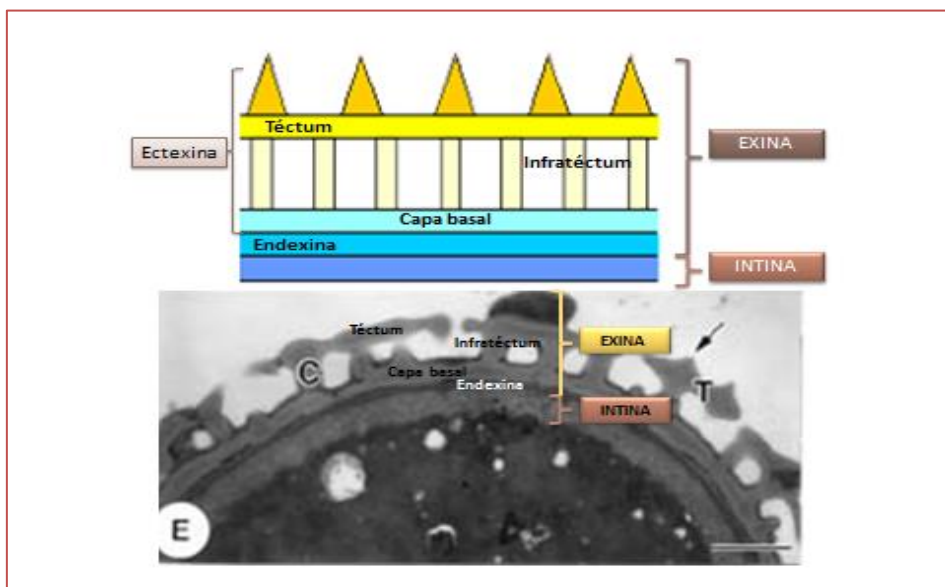


Figura 5. Estructura de un grano de polen: a) Esquema de una sección del grano; b) Fotografía de la pared del grano de polen de *Cuscuta* (Convolvulaceae) mediante microscopía electrónica de transmisión [4].

- La intina es la capa más interna de la pared del grano de polen, en contacto con el protoplasma. Sus componentes principales son celulosa, pectinas y glucoproteínas. No es resistente a los ácidos y se destruye fácilmente con la acetólisis. Puede considerarse equivalente a la pared de celulosa típica del resto de células vegetales formando

una capa continua, no interrumpida alrededor de todo el grano de polen.

La mayor parte de los granos de polen, en el momento de la dehiscencia de la antera, están recubiertos por una sustancia más o menos pegajosa llamada *pollenkitt* o *manto polínico* y está secretado por las células del tapete². Está compuesto fundamentalmente por lípidos, carotenos, polisacáridos y glucoproteínas en proporciones variables. Aunque el significado del manto polínico está poco claro, parece que no sólo actúa como protector de los granos de polen frente a factores ambientales, evitando la desecación y el ataque de ciertos hongos o parásitos, sino que además interviene en el reconocimiento de polen estigma.

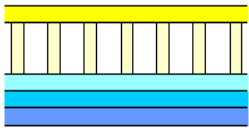
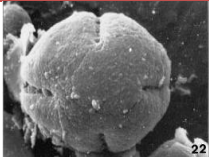
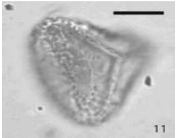
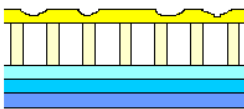
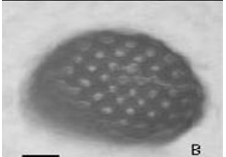
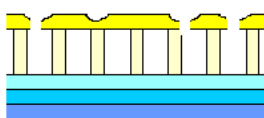



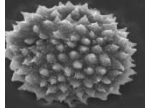
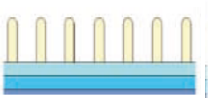

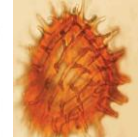


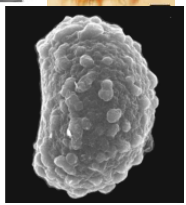

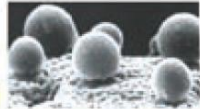
La composición y consistencia del manto polínico del polen de plantas de polinización entomófila y anemófila es diferente. En los granos de polen anemófilos, la presencia de proteínas hace suponer que o bien el pollenkitt tiene capacidad alergénica o por el contrario, que actúe de forma mecánica facilitando la salida de proteínas alergénicas difusibles, procedentes del interior del grano de polen.

La **ornamentación** o relieve de los granos de polen suele estar formada por los elementos esculturales que se disponen en la superficie del mismo. En general, son una respuesta adaptativa a los procesos de dispersión y polinización, adoptan diversas formas y, por lo general, no sobrepasan las 5 µm de altura.

En la tabla 1 se detallan los tipos de pólenes en función del relieve en la exina.

² *Células del tapete*: En botánica, se denomina tapete a la capa de células de la antera que rodean a las células madre de la microspora y, más tarde, a los granos de polen. El tapete está constituido por células ricas en sustancias nutritivas, ya que son las encargadas de nutrir a las células madres de las microsporas durante todo su desarrollo. Las **células** del tapete pueden tener uno o varios **núcleos** celulares dependiendo del taxón considerado.

Tabla 1. Tipos de superficie del polen 5.

Tipo de superficie	Descripción	Ejemplo	REF.
Psilada	Superficie prácticamente lisa	 	6
Fosulada	Superficie lisa con hendiduras diminutas	 	7
Foveolada:	Superficie lisa con lagunas diminutas, redondeadas, diámetro aproximadamente de 1 μm y dispuestas irregularmente.	 	8
Escábrida	Superficie con elementos esculturales que no sobrepasan 1 μm de longitud		9
Equinada	Superficie con espinas y agujones mayores de 3 μm . Si son menores se denomina equinulada	  	10
Baculada	Superficie con elementos esculturales en forma de bastón	  	11
Verrugosa	Superficie con elementos esculturales no puntiagudos, de altura mayor a 1 μm	  	12
Gemada	Superficie con elementos esculturales de anchura igual o mayor que la altura y con la parte basal constreñida	 	5

Tipo de superficie	Descripción	Ejemplo	REF.
Pilada	Superficie con elementos esculturales constituidos por una cabeza más o menos gruesa y un cuello que la sostiene.		5
Reticulada	Superficie semi-tectada con muros y lúmenes ordenados conforme a las mallas de una red.		5

Las **aperturas del polen** son áreas especialmente definidas o adelgazamientos de la exina, en los cuales la intina puede ser más gruesa. Además de facilitar el intercambio iónico del interior del grano con el exterior, a través de ellas normalmente, emerge el tubo polínico en el momento de la fecundación.

Otra función importantísima de las aperturas, es la de facilitar la acomodación del volumen de los granos a los cambios de humedad, es lo que se denomina “harmomegatia”. La descripción de las aperturas del polen se basa principalmente en los siguientes aspectos: número, forma y posición.

El número de aperturas es muy variable y puede haber pólenes inaperturados, mono-, di-, tri- o poliaperturados, cuando pasan de cuatro aperturas.

La forma de las aperturas. Existen dos tipos:

- Aperturas simples. Se distinguen tres tipos:

- alargadas (forma de surco) dan origen a un polen “colpado”;
- redondas (forma de poro) dan origen a un polen “porado”;
- en bandas o anillos completos circundando a uno de los polos del grano (sulcos), dan origen a un polen “sulcado”.

- Aperturas compuestas, generalmente constituidas por golpes, como ectoaperturas y poros, como endoaperturas.

La determinación de la posición de las aperturas resulta difícil en granos solitarios y en tétradas. Se diferencian dos tipos de posiciones: en el polo proximal o en el polo distal. En el primer caso, la mayoría de las aperturas están dispuestas en el eje polar, mientras que en el segundo caso, lo hacen en el eje ecuatorial.

El **tamaño del grano** de polen es considerado un carácter con valor taxonómico, ya que en general, permanece constante dentro de una misma especie. No obstante, su variación dentro de un taxón concreto puede ser indicativo de un origen híbrido o de diferentes estados de madurez. Los granos de polen pueden oscilar entre 5 μm , como por ejemplo *Myosotis*, y 300 μm , como es el caso de algunas *Annonaceae* o *Pinaceae*.

La **polaridad** del grano de polen está relacionada con la orientación de las microsporas en la tétrada meiótica, en las cuales existen dos partes o polos y a partir de ellos se pueden trazar los ejes polares y ecuatoriales. Atendiendo a esto, los granos de polen pueden ser:

- Apolares: Los polos ecuatorial y polar no se distinguen
- Polares: Diferenciándose en *isopolares* y *heteropolares*; en el primero el plano divide el grano en dos mitades similares y en el segundo, ambas partes son desiguales.

Por último, la **forma de los granos** de polen está relacionada con el tipo de apertura, polaridad y simetría. En Angiospermas, el polen puede tener una forma fija o no fija. La forma no fija es poco frecuente y solamente se ha observado en Angiospermas marinas como *Zostera* y *Posidonia*. La forma fija se puede dividir en dos tipos:

- Navicular: El eje polar y el eje ecuatorial tienen distinta longitud. Si el eje polar es más corto que el ecuatorial, el polen es navicular oblado. Por el contrario, si el eje ecuatorial es más corto que el eje polar, el polen es navicular prolado.
- Globoso: El eje polar y ecuatorial son aproximadamente de la misma longitud.

En las Gimnospermas los granos de polen presentan también formas variadas pero en menor proporción que las Angiospermas. En esta clase

predominan los granos “sacados” con vesículas áreas que facilitan su dispersión (Pinaceae), circulares (Gnetum, Cupressaceae) o naviculares (Ephedra, Welteitschia).

En la figura 6 se muestra un resumen de la morfología y estructura de los granos de polen, descrita en este apartado.

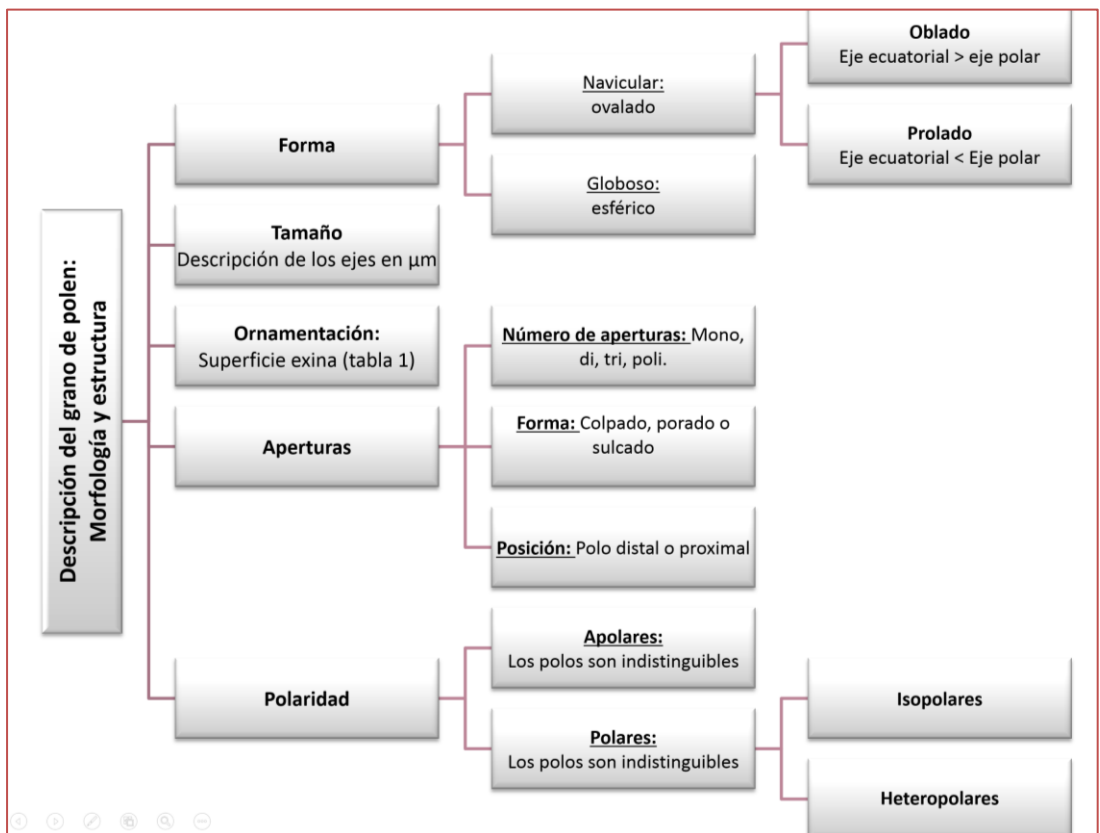


Figura 6. Morfología y estructura del grano de polen.

1.2.2. Distribución en España

El polen como partícula en la atmósfera ha sido estudiado a lo largo de los años y ha ido incrementado el interés en el mundo científico, sobre todo con lo relacionado a la salud. Prueba de ello es el aumento considerable de investigaciones y publicaciones científicas sobre el tema y la creación de

asociaciones importantes a nivel tanto nacional como mundial, como son La Red Española de Aerobiología (REA) ¹³, en colaboración con universidades de Reino Unido, y la Asociación Española de Aerobiología (AEA) ¹⁴, donde se recoge información y comunicación entre investigadores.

La REA tiene distribuidas por España distintas estaciones de muestreo en zonas previamente estudiadas, evitando edificios colindantes, en superficie llana y horizontal, con cierta elevación, etc. En la figura 7 se muestran las estaciones de muestreo que están operativas en el año 2014. Estas estaciones de muestreo captan el aire mediante distintas técnicas, la más utilizada es la de captadores volumétricos de succión.



Figura 7. Estaciones de muestreo de REA

La REA, entre sus numerosas tareas, ofrece información sobre la situación actual de polen a través de mapas de polen libre y confecciona mapas de incidencia polínica, pudiendo determinar la distribución de los distintos

pólenes en la atmósfera, según el grado de incidencia mostrado en dicho mapa.

En la figura 8 se detallan mapas de incidencia polínica para los pólenes más importantes en España. La Red Española de Aerobiología propone una serie de categorías polínicas, considerando distintos umbrales, que posibilitan la clasificación de las concentraciones polínicas resultantes de los muestreos. Dichas categorías facilitan la expresión gráfica de los resultados en mapas sobre la situación actual y una posible previsión. De esta manera el usuario obtiene una mejor comprensión de la información generada. Con el establecimiento de las diferentes categorías polínicas se intenta homogeneizar la información aerobiológica en el territorio nacional, teniendo en cuenta los diferentes pisos bioclimáticos y unidades biogeográficas existentes. Sin embargo, en ocasiones y para algunos tipos polínicos en particular, han de establecerse categorías y umbrales de concentración polínica a nivel local o regional teniendo en cuenta los numerosos factores que condicionan su presencia: abundancia de la especie en una zona concreta, presencia de otras especies con las que puede establecer relación de reactividad cruzada, presencia de contaminantes atmosféricos, condiciones meteorológicas particulares, etc., y que intervienen en la aparición de síntomas en las personas afectadas de polinosis. En el establecimiento de los umbrales para definir las diferentes categorías se han tenido en cuenta:

- el carácter anemófilo/entomófilo de las distintas especies;
- el Índice Polínico Anual;
- la posible capacidad alergógena de las distintas especies.

De acuerdo a estos factores, se han establecido cuatro grupos que incluyen diferentes tipos polínicos. En cada uno de ellos, se han delimitado cuatro categorías: nulo, bajo, moderado o alto, que hacen referencia a umbrales de concentración de polen necesarios para que un porcentaje bajo, medio o alto de la población sensible desarrolle los síntomas asociados a la presencia de estos tipos polínicos. En base a estos criterios los diferentes tipos polínicos se han repartido en 4 grupos con umbrales polínicos diferentes para cada categoría.

- Grupo 1: Parietaria, Urtica membranacea, Mercurialis, Echium, Fabaceae, Apiaceae, Cannabis, Brassicaceae.
 - Categorías: Nulo: <1 grano/m³
 - Bajo: 1-15 granos/m³
 - Moderados: 16-30 granos/m³
 - Altos: >30 granos/m³
- Grupo 2: Poaceae, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, Plantago, Rumex, Artemisia, Ericaceae, Asteraceae, Helianthus
 - Categorías: Nulo: <1 grano/m³
 - Bajo: 1-25 granos/m³
 - Moderados: 26-50 granos/m³
 - Altos: >50 granos/m³
- Grupo 3: Betula, Casuarina, Corylus, Castanea, Eucalyptus, Alnus, Acer, Populus, Ulmus, Ligustrum.
 - Categorías: Nulo: <1 grano/m³
 - Bajo: 1-30 granos/m³
 - Moderados: 31-50 granos/m³
 - Altos: >50 granos/m³
- Grupo 4: Olea, Cupressus, Platanus, Populus, Quercus, Pinus.
 - Categorías: Nulo: <1 grano/m³
 - Bajo: 1-50 granos/m³
 - Moderado: 51-200 granos/m³
 - Altos: >200 granos/m³

Con estas categorías y atendiendo a los resultados visualizados en la figura 8, hay pólenes con un impacto elevado en todo el país, como son gramíneas, robles y encinas o pólenes con un impacto elevado en zonas muy concretas, como sucede con el ciprés en la Comunidad Autónoma de Madrid y en la región comprendida entre Granada y Almería.

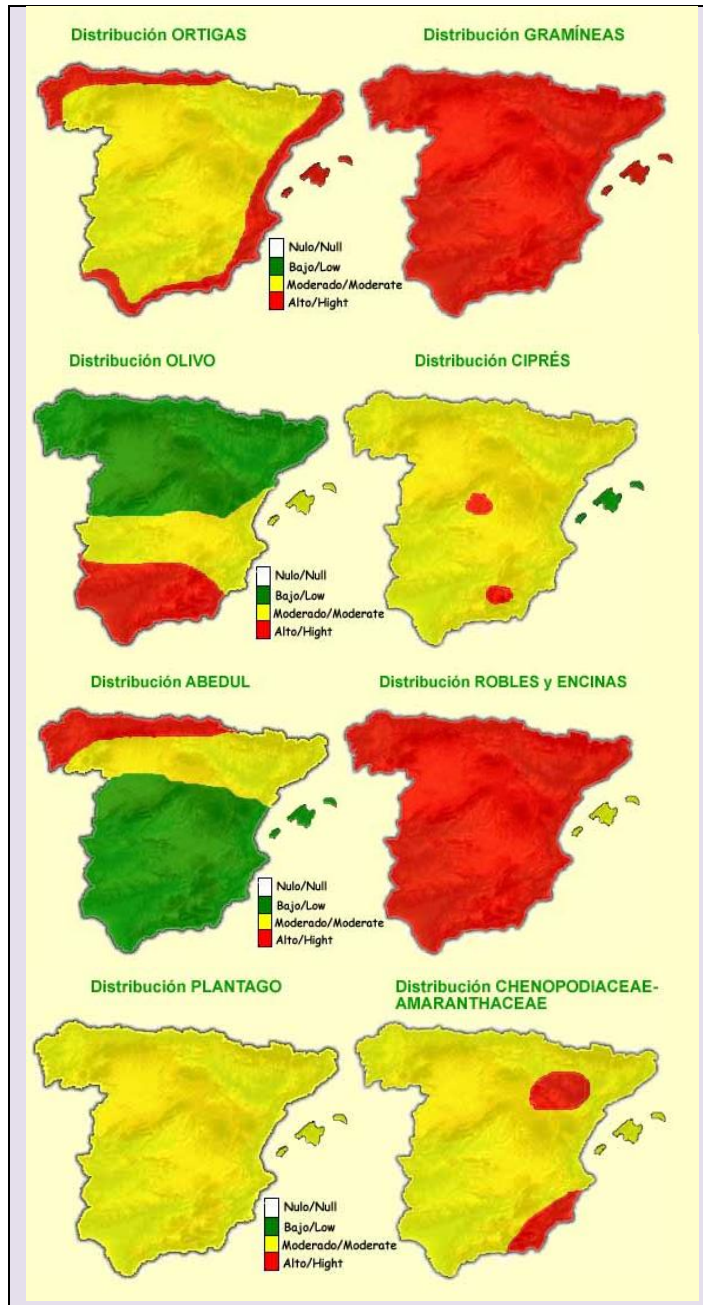


Figura 8. Mapas de incidencia polínica para los pólenes más presentes en la atmósfera en España (2013)

Con los datos reflejados en dicha figura y mediante estudios estadísticos se construyen mapas predictivos periódicos, información muy útil para la sociedad entera, ya que, en definitiva, se predice la calidad del aire.

1.2.3. Distribución en la Comunidad Autónoma de Madrid

El hecho de informar del estado del aire les corresponde a las Comunidades Autónomas. En el caso de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), La Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad tiene disponible, en el Portal de Salud, una sección para el polen, en donde cualquier usuario puede consultar un boletín de predicción del polen, un boletín semanal, predicciones anuales o informes con datos de polen de años anteriores (un histórico del polen)¹⁵.

En la figura 9 se muestra un mapa con la distribución de pólenes en relación a los puntos de muestreo que existen en la CAM (REA). Además, el usuario puede consultar los últimos datos obtenidos en una estación de muestreo en particular; en la misma figura se muestran los datos obtenidos en la estación de muestreo de Ciudad Universitaria.

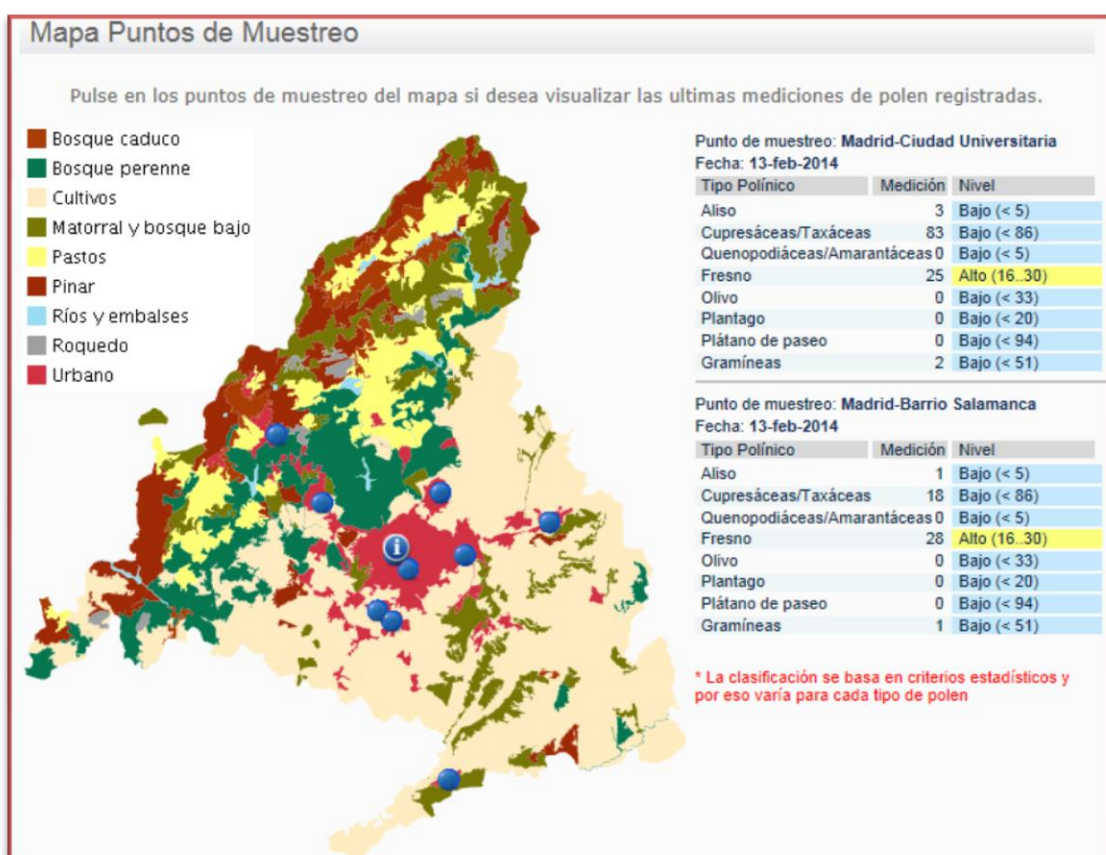


Figura 9. Mapa de distribución de polen en la CAM el 13.02.2014

Con los datos aportados por la CAM desde 1995 hasta la actualidad con distintos tipos de pólenes, se ha elaborado la gráfica representada en la figura 10. Cabe destacar el aumento del plátano oriental a lo largo de los años.

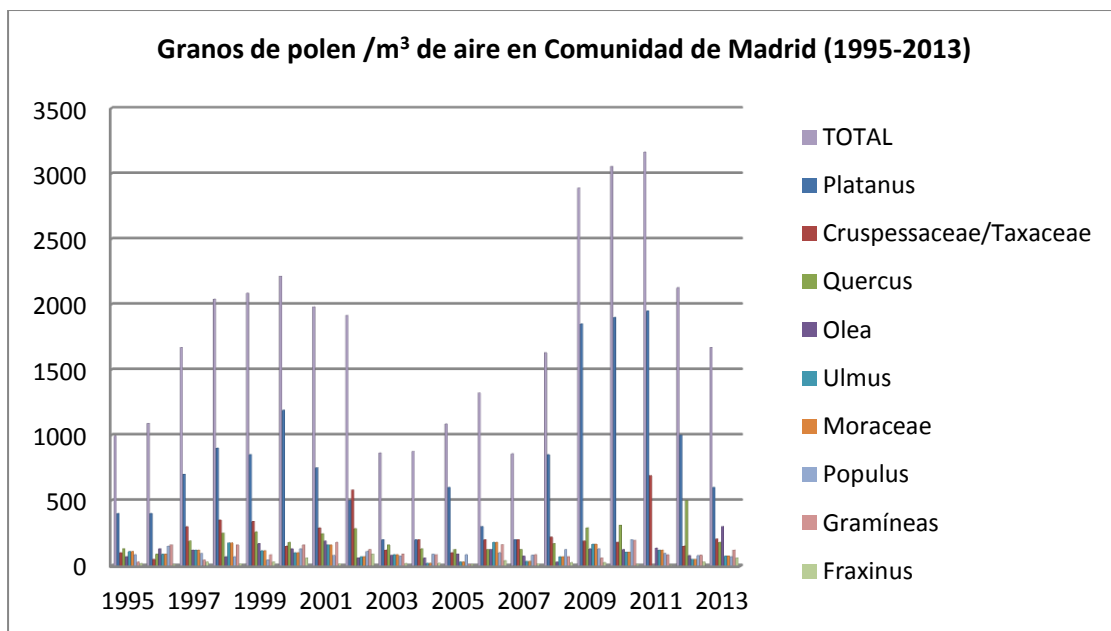


Figura 10. Histórico del polen total en la CAM desde 1994

1.3. Sistema inmunológico 16,17

Se entiende por inmunidad al conjunto de mecanismos que un individuo posee para enfrentarse a la invasión de cualquier cuerpo extraño y para hacer frente a la aparición de tumores. Esta cualidad se adquiere antes del nacimiento y se madura y afianza en los primeros años de vida. En los vertebrados implica que los organismos diferencian lo propio de lo ajeno, es decir, reconocen todos sus tipos celulares.

El sistema inmune es el responsable de conferir inmunidad. Este sistema, presente también en invertebrados, alcanza su máxima complejidad en los primates y seres humanos. La ciencia encargada de estudiar estos procesos se denomina Inmunología.

El sistema inmune es un sistema biológico complejo. Se encuentra distribuido por todos los órganos y fluidos vasculares e intersticiales, excepto el cerebro, concentrándose en órganos especializados como la médula ósea, el bazo, el timo y los nódulos linfáticos (figura 11). Es el responsable de conferir la inmunidad al actuar todos sus componentes de una forma coordinada.

Presenta componentes celulares: linfocitos, macrófagos, mastocitos y granulocitos, y moléculas solubles: anticuerpos, linfocinas y complemento.

Las células y moléculas que participan en la defensa inmune llegan a la mayor parte de los tejidos por el torrente sanguíneo que pueden abandonar a través de las paredes de los capilares y al que pueden regresar por el sistema linfático.

La estructura que nos ayuda a mantenernos sanos frente a las enfermedades y sustancias extrañas, está compuesta por una complicada red de vasos, válvulas, conductos, ganglios y órganos. Su función consiste en producir, filtrar y transportar linfa; además de fabricar algunas células sanguíneas que intervienen en la defensa corporal.

AMÍGDALAS

EN CONJUNTO CON LOS ADENOIDES PRODUCEN ANTICUERPOS.

ADENOIDE

GLÁNDULAS SALIVALES

TIMO

EN ÉL SE MULTIPLICAN Y DESARROLLAN PARA FORMAR LINFOCITOS T, LAS CÉLULAS PRIMITIVAS FORMADAS EN LA MÉDULA ÓSEA.

GANGLIOS AXILARES

CISTERNA DEL QUILO

VASOS LINFÁTICOS DE LA PARTE INFERIOR DEL CUERPO CONVERGEN PARA FORMAR ESTE VASO.

GANGLIOS

AÓRTICOS LATERALES

GANGLIOS

ILIACOS COMUNES

GANGLIOS

ILIACOS EXTERNOS

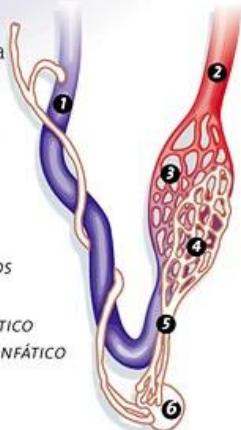
GANGLIOS

INGUINALES PROFUNDOS

CONDUCTOS LINFÁTICOS

Sirven para transportar la linfa desde los tejidos hacia el corazón.

- 1 VENA
- 2 ARTERIA
- 3 CAPILARES SANGUÍNEOS
- 4 CAPILARES LINFÁTICOS
- 5 VASO LINFÁTICO
- 6 GANGLIO LINFÁTICO



GANGLIO SUPRATROCLEAR

CONDUCTO TORÁCICO

VENAS SUBCLAVIAS
EN ELAS SE VIERTE LA LINFA QUE SE ACUMULA EN EL CUERPO.

BAZO

ES EL MÁS GRANDE DE LOS ÓRGANOS LINFÁTICOS. ALMACENA ALGUNOS LINFOCITOS.

ESTÓMAGO

DEBIDO A LA ACCIÓN DE ENZIMAS Y ÁCIDOS EN ÉL SE DESTRUYEN LOS ORGANISMOS QUE HAN SIDO INGERIDOS.

PLACA DE PEYER

SON AGRUPACIONES DE TEJIDO LINFÁTICO QUE SE UBICAN EN LA PARTE BAJA DEL INTESTINO DELGADO.

MÉDULA ÓSEA

CONSTITUYE EL INICIO DE LA VIDA DE LOS LINFOCITOS. TAMBIÉN PRODUCE LOS MONOCITOS QUE LUEGO SE TRANSFORMAN EN MACRÓFAGOS.

GANGLIOS LINFÁTICOS POPLÍTEOS

RECOPEN EL EXCESO DE LINFA DE PIERNAS Y PIES.

PIEL

PRIMERA BARRERA MECÁNICA QUE DEBEN EVITAR LOS ORGANISMOS INVASORES.

CAPILARES LINFÁTICOS

VASOS LINFÁTICOS

DESDE LOS CAPILARES LINFÁTICOS, LA LINFA FLUYE HACIA LOS VASOS LINFÁTICOS.

Figura 11. Órganos del sistema inmune en la especie humana

1.3.1. Mecanismos de defensa

Se distinguen dos tipos de mecanismos de defensa: los innatos, los cuales se encuentran de forma natural, es decir, en presencia y ausencia de antígenos, y los adquiridos, sólo presentes ante un invasor.

En las figuras 12 y 13 se muestran de forma esquemática ambos mecanismos incluyendo las barreras de cada una.



Figura 12. Mecanismos innatos

Según el esquema de la figura 12, los mecanismos innatos externos intentan evitar la entrada de un antígeno pero en caso de superarlos, actúan los mecanismos innatos internos. A continuación, se describen las barreras de este mecanismo, presentados en esta figura:

- **Células asesinas naturales (Killer K y Natural Killer NK).** Atacan a las células recubiertas por anticuerpos y segregan perforinas (crea orificios en la membrana de las células atacadas, matándolas), como los

- linfocitos Tc para destruirlas, pero se trata de una actuación inespecífica, ya que no diferencian los distintos tipos de anticuerpos. Destruyen células afectadas por virus y cancerosas, así como las pertenecientes a órganos trasplantados.
- **Interferón (IFN).** Son moléculas de naturaleza proteica segregadas por las células infectadas por virus. El IFN actúa en dos niveles: por un lado, evita la replicación vírica en células aún sanas y por otro, favorece la destrucción de las células ya infectadas por el virus.
 - **Complemento.** Consta de un conjunto de moléculas plasmáticas cuya función es potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células, incluyendo la apoptosis (el suicidio celular). Cuando se activa alguno de sus componentes por diversas sustancias como polisacáridos o anticuerpos, se originan una serie de reacciones en cadena. El complemento es uno de los componentes fundamentales de la respuesta inmunitaria en la defensa ante un agente hostil.
 - **Macrófagos:** células fagocíticas mononucleares que atacan al patógeno ingiriéndolo. Son monocitos que han sufrido procesos de maduración aumentado su tamaño y adquiriendo un aparato de Golgi prominente y numerosos lisosomas.
 - **Respuesta inflamatoria:** La respuesta inflamatoria es parte de la inmunidad innata y se presenta cuando los tejidos son lesionados por bacterias, traumas, toxinas, calor o cualquier otra causa. Ciertas células parecen haber sido diseñadas para organizar inflamaciones de emergencia, a menudo en cuestión de segundos: son los mastocitos situado en los tejidos y, probablemente, los basófilos en la sangre. El patógeno los activa liberando grandes cantidades de mediadores inflamatorios. Estas sustancias químicas, incluyendo la histamina, bradiquinina, serotonina y otras, son liberadas y hacen que los vasos sanguíneos derramen líquido en los tejidos, lo que deriva en una inflamación localizada. Esto ayuda a delimitar y aislar la sustancia extraña del contacto con otros tejidos corporales.

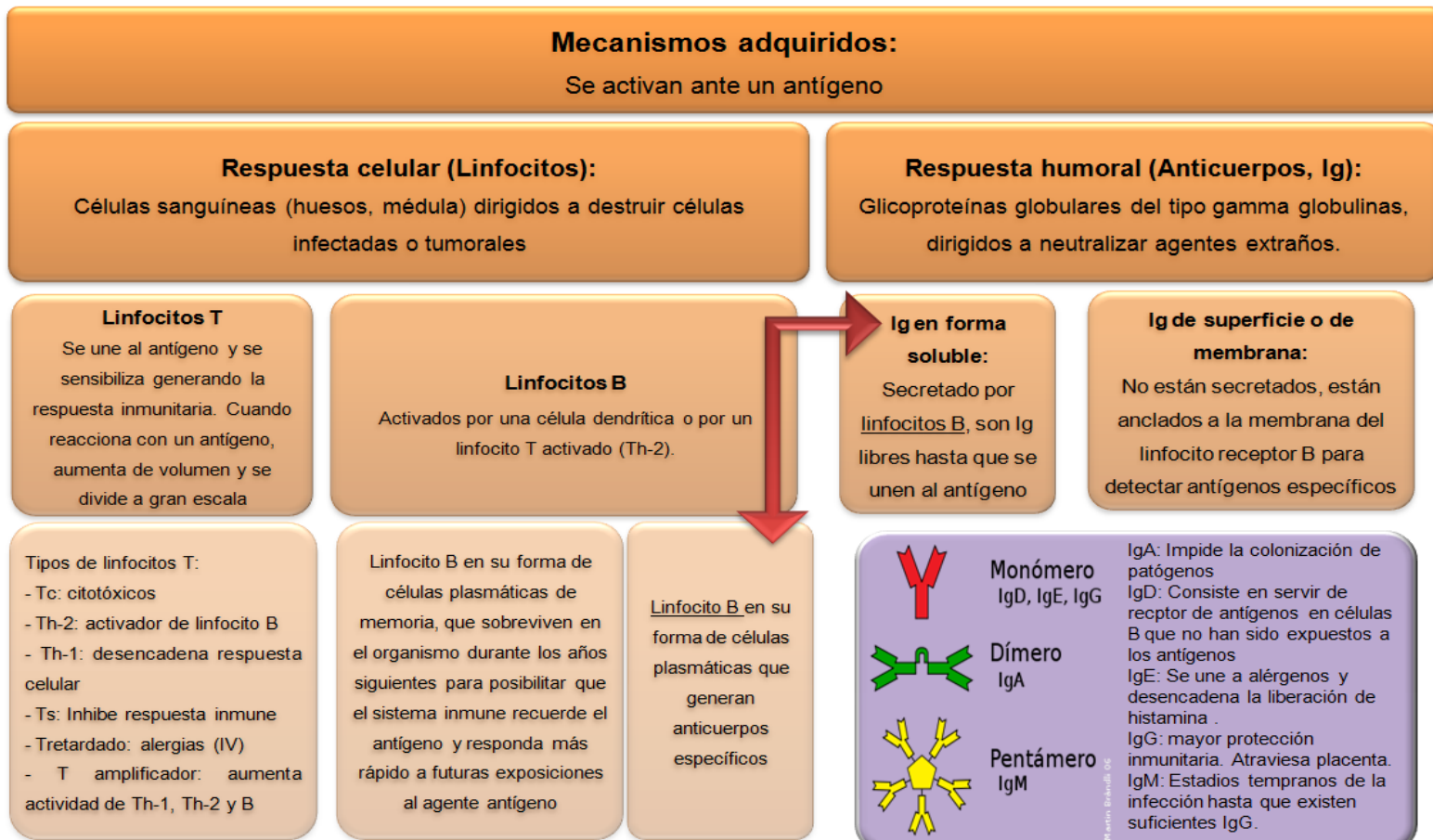


Figura 13. Mecanismos adquiridos

En la figura 14 se incluye un ejemplo con las diferentes respuestas inmunes ante un virus. En esta figura un virus atraviesa las barreras de defensa de los mecanismos innatos externos (piel, mucosa, etc.) y entra en contacto con una célula sana (1) infectándola (2); tras la infección se activan las células asesinas, destruyendo a la célula infectada (2). A continuación, un macrófago fagocita la célula infectada destruida (3); una célula dendrítica se une a uno de los restos del antígeno y lo expone en su membrana (4) actuando como APC (célula presentadora de antígeno) presentándolo a un linfocito T el cuál se activa (5); en este punto surgen dos caminos: que los linfocitos T activados se dividan a gran escala para buscar y destruir las células infectadas (6A y 7A) y que los linfocitos T activado presente el antígeno a los linfocitos B activándolos (6B), el cuál producirá anticuerpos a gran escala que neutralizarán los virus libres (7B y 8), y se crearan células de memoria (9).

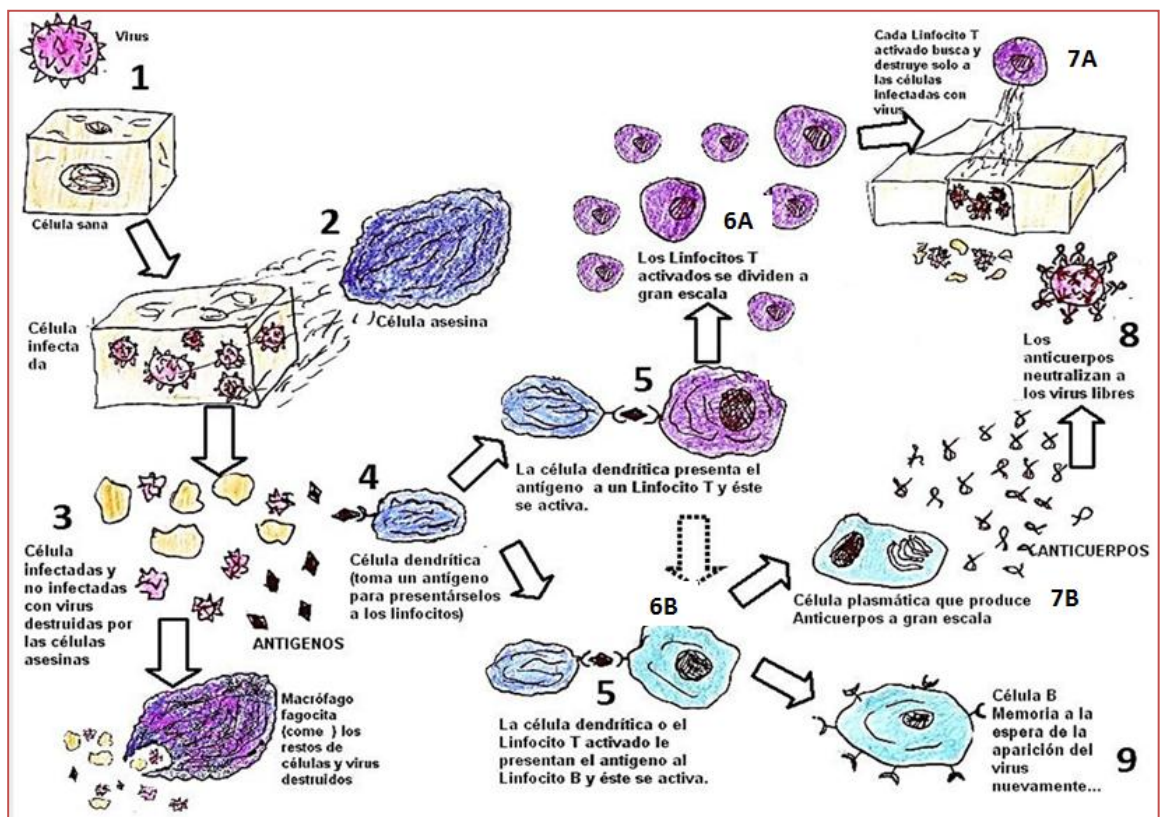


Figura 14. Ejemplo de los diferentes mecanismos de defensa frente el ataque de un virus 18.

1.3.2. Alérgenos

A instancias de la Biología y de la Medicina, un **antígeno** es la sustancia que, introducida en el organismo animal, determinará en él una reacción inmunitaria como por ejemplo la formación de anticuerpos. Respecto de la sustancia, se admiten todas aquellas que puedan ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, ya sean propias o ajenas.

Las moléculas ajenas a un organismo, que son reconocidas como tales y desencadenan en él una respuesta inmunitaria, se denominan antígenos. Tienen una serie de características **19**:

- Son moléculas de gran tamaño, principalmente polisacáridos complejos, y proteínas (libres, o asociadas a glúcidos o a lípidos. Los lípidos puros no son inmunógenos). Muchas moléculas sintéticas actúan también como antígenos.
- Tienen un peso molecular elevado (superior a 10000 daltons), aunque excepcionalmente se conocen proteínas más pequeñas (como la insulina o el glucagón) que sí inducen respuesta inmune.
- Pueden ser moléculas libres o que forman parte de estructuras biológicas.
- Tienen una estructura terciaria que conlleva una conformación tridimensional que, si se pierde, lo hace también la capacidad de reconocimiento por parte del anticuerpo.
- Para que el sistema inmunitario desencadene una respuesta cuando detecta la presencia de Ag es preciso que estos se reconozcan como tales. Este reconocimiento se produce mediante la unión selectiva de los antígenos con ciertas moléculas denominadas **receptores antigénicos** situados en la membrana plasmática de algunas células del organismo. El Ag no se une al receptor antigénico en su totalidad, sino por una zona llamada **epítipo** o **determinante antigénico** que suele estar constituida por una corta secuencia de aminoácidos (entre 4 y 5).

Existen diferentes tipos de antígenos, por ejemplo, dependiendo del origen:

- **AUTOANTÍGENOS**: Ocasionan una respuesta autoinmune. Proceden del mismo individuo en el que provocan la respuesta inmune.

- ALOANTÍGENOS: Proceden de otro individuo de la misma especie (antígenos HLA o de los grupos sanguíneos ABO y factor Rh, entre otros)
- XENOANTÍGENOS: Procedentes de otra especie diferente (por ejemplo antígenos virales).

Un alérgeno es una sustancia que provoca una reacción alérgica excesiva o de hipersensibilidad (ver apartado 3.3.3.) en personas susceptibles y que han tenido algún tipo de contacto con dicho alérgeno. La reacción viene provocada por el sistema inmunológico que entiende el alérgeno como una sustancia peligrosa para el organismo y reacciona ante ella con el objetivo de atacarla. Por tanto, un alérgeno actuaría como un antígeno para personas susceptibles a él.

1.3.2.1. Tipos y clasificación

Existen muchos tipos de alérgenos que podrían clasificarse de varias formas. A continuación se presentan algunos ejemplos.

En función de su origen:

- Los derivados de fuentes naturales **20**
- Los generados por la actividad doméstica o profesional humana **21**.

Esta distinción tiene una validez clínica, teniendo en cuenta que la evitación de alérgenos redundaría en el mejor control de la enfermedad. Además, la actividad humana influye en gran manera en la intensidad y distribución de las fuentes de alérgenos en la naturaleza.

En función de los tipos de alergias que desarrollan:

- Alérgenos alimentarios, que son alimentos que producen reacciones alérgicas a personas sensibles a ellos. Se produce una alergia a los alimentos cuando el sistema inmunitario por error lucha contra la comida (un alérgeno) y, como si fuera una amenaza, lo ataca. Esto significa que el sistema inmunitario produce cantidades anormalmente grandes de un anticuerpo llamado inmunoglobulina

E (IgE, para abreviar). A diferencia de otros tipos de trastornos alimenticios, como las intolerancias, las alergias alimentarias son mediadas por “IgE”. Los anticuerpos IgE combaten a los enemigos alérgenos alimentarios mediante la liberación de histamina y otros químicos, que desencadenan los síntomas de una reacción alérgica, como se describe en el apartado 1.3. Una reacción alérgica a los alimentos puede afectar a la piel, al tracto gastrointestinal, al tracto respiratorio y, en los casos más graves, al sistema cardiovascular. Las reacciones pueden variar de leves a severas, incluyendo la potencialmente mortal llamada anafilaxia. Existen más de 120 alimentos que pueden causar alergias. Los alimentos que comúnmente causan reacciones alérgicas graves a nivel mundial son la leche, el huevo, los cacahuetes (maní), los frutos secos, los cereales (principalmente trigo), soja, pescado y mariscos. La mayoría de reacciones alérgicas en los niños son debido a un número limitado de alimentos. La alergia al huevo y a la leche suelen superarse durante los primeros años de vida. Las frutas, verduras, frutos secos y cacahuetes son responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas en adultos.

- Alérgenos respiratorios, que son alérgenos que se encuentran en el aire (aeroalergenos) o que se introducen el organismo por el sistema respiratorio. Por tanto, las alergias respiratorias pueden desarrollarse a consecuencia de una combinación de varios estímulos ambientales, como los ácaros del polvo, el polen (en concreto el que se transmite por el viento y no el que se es transportado por insectos), la caspa animal o los contaminantes del aire. Estos alérgenos respiratorios suelen encontrarse por el aire, lo que les permite entrar en las fosas nasales, los pulmones y los ojos, donde pueden causar irritación e inflamación. De acuerdo con la Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología, los síntomas de las alergias respiratorias son diversos y pueden ser indicativos de enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis o la neumonía. Mientras que estos alérgenos normalmente no producen anafilaxia, sí pueden causar síntomas muy molestos que pueden afectar gravemente la salud de una persona y su calidad de vida, como son la rinitis alérgica, asma y eczema o urticaria. Los

síntomas en el caso de alergia al polen suelen incluir la rinitis alérgica (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica (alergias oculares) y asma alérgica.

- Alérgenos cutáneos, que son aquellos que al entrar en contacto con la piel, provocan una respuesta en el sistema inmunológico, como son la alergia a algunos metales, al sol o al sudor, etc. Los síntomas más habituales son la urticaria, que se define como un proceso inflamatorio de la zona superficial de la piel cuya manifestación típica es el habón o roncha, o la aparición de angioedema, que se define como un proceso inflamatorio de la zona profunda de la piel; aunque estas reacciones no son exclusivas a alergias cutáneas.

1.3.3. Respuesta alérgica

Existe una gran proporción de individuos que desarrollan una respuesta inmune excesiva adaptativa frente a sustancias inofensivas para el organismo. Este tipo de respuestas inmunes frente a sustancias extrañas no infecciosas puede producir una patología clínica que se conoce como reacción alérgica, reacción de hipersensibilidad o simplemente alergia. En consecuencia, las alergias son respuestas inmunes exageradas a antígenos inofensivos (alérgenos) en individuos sensibilizados.

Se distinguen cuatro tipos de alergias atendiendo a los componentes del sistema inmune que inician la respuesta (las tres primeras son de respuesta humoral (IgE, IgG) y la cuarta es de respuesta celular (linfocitos T)), y la naturaleza del alérgeno (soluble o asociado a membranas). Por otra parte, dentro de cada tipo de alergia, dependiendo de la ruta de entrada y de la dosis del alérgeno, las características clínicas desarrolladas son diferentes.

En la tabla 2 se describe ejemplos de enfermedades causadas por reacciones de hipersensibilidad frente a distintas categorías de antígenos indicadas entre paréntesis, que serán definidos en los apartados posteriores.

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades causadas por reacciones de hipersensibilidad frente a distintas categorías de antígenos.

Mecanismos de hipersensibilidad	Alérgenos	³ Patógenos	Aloantígenos	Autoantígenos
Tipo I (IgE/mastocitos, respuesta inmediata)	Rinitis alérgica (polen)	Choque anafiláctico (rotura de quiste)	-	-
Tipo II (IgG)	Anemia hemolítica (penicilina)	-	Reacción transfusional (Rh)	Miastenia grave (receptor de acetilcolina)
Tipo III (IgG, inmunocomplejos)	Pulmón del granjero (hongo de la paja)	Glomerulonefritis (post-estrptocococos)	-	Lupus (ADN)
Tipo IV (linfocitos T, respuesta retardada)	Dermatitis por contacto (níquel)	Lepra tuberculoide (micobacterias)	Rechazo agudo (HLA)	Diabetes insulino dependiente (células β)

1.3.3.1. Hipersensibilidad de tipo I

El organismo reacciona frente a alérgenos solubles, mediante respuesta de tipo IgE Fc-dependiente. Este tipo de reacción es prácticamente inmediata, desarrollándose la respuesta en segundos o minutos.

En este tipo se encuentra la inhalación de ciertos alérgenos como es el polen. La mayoría de los individuos inhalan constantemente ciertos alérgenos (polen) sin que se produzca respuesta inmune apreciable. No obstante, ciertos individuos denominados atópicos, presentan una tendencia genética a desarrollar intensas respuestas medidas por la IgE contra estos alérgenos.

La primera etapa es la “fase de sensibilización”, donde el individuo atópico entra en contacto con el alérgeno. Los alérgenos que son inhalados o

³ Patógeno: entidad biológica o compuesto que tiene la capacidad de promover una enfermedad al ser humano. En este caso, la parte de esa entidad que puede ser reconocida por el sistema inmune para desencadenar una respuesta de defensa sería el antígeno.

que atraviesan la piel son captados por células presentadoras de antígeno y los transportan a los ganglios linfáticos dónde son presentados a los linfocitos Th2; éstos promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos B específicos del alérgeno y favorecen su cambio de isotipo hacia células productoras de IgE. El resultado de esta etapa no es la de producir una sintomatología clínica, sino que es la de producir anticuerpos IgE específicos para ese alérgeno que se van a unir a los mastocitos que se encuentran localizados debajo de la piel, en la mucosas y asociados a los vasos sanguíneos.

La segunda etapa es la de “re-exposición”, donde si un individuo sensibilizado previamente (primera etapa) se expone nuevamente ante ese alérgeno, se produce un reconocimiento de la IgE que va a causar la desgranulación de los mastocitos produciendo una reacción inflamatoria inmediata. Dependiendo de la cantidad de alérgeno se puede continuar con una reacción tardía más o menos intensa, con un máximo a las 6-9 horas. Esta reacción tardía se produce por la síntesis inducida de nuevos mediadores como numerosas quimiocinas y citosinas (IL4, IL5, IL9, IL13 o TNF α), que prolongan la reacción inflamatoria y reclutan al foco inflamatorio a células fagocitarias mononucleares (monocitos), células fagocitarias polimorfonucleares (eosinófilos y basófilos) y linfocitos. Estas células reclutadas son las causantes del daño tardío y la prolongación de moco asociado con las reacciones alérgicas crónicas.

En la figura 15 se esquematiza la respuesta inmune de tipo I.

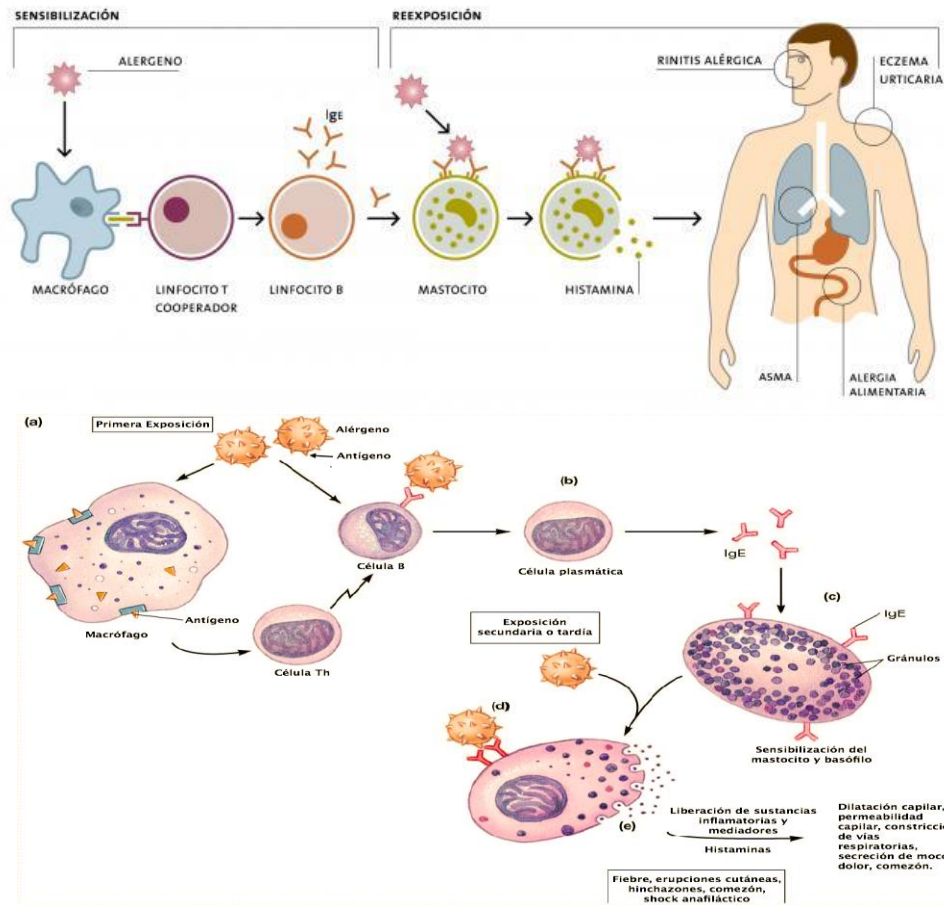


Figura 15. Respuesta alérgica de tipo I: a) etapas de la respuesta alérgica, b) respuesta e implicación del sistema inmune

En función de la vía de entrada y de la dosis del antígeno soluble al individuo sensibilizado se desarrollan distintas formas de reacciones alérgicas con una sintomatología muy variada. En la tabla 3 se muestran esquematizados diferentes ejemplos de sintomatología y reacciones alérgicas mediadas por la IgE en función de la vía de entrada.

Tabla 3. Alergias medidas por IgE (tipo I)

Enfermedad	Tipo de alérgeno	Ruta de entrada	Respuesta
Anafilaxia sistémica	Medicamentos (penicilina) Venenos de abeja y avispas	Intravenoso	Edema, vasodilatación, oclusión traqueal, colapso circulatorio y muerte
Inflamación local	Picaduras de insectos, pruebas cutáneas de alergia	Subcutánea	Vasodilatación local, edema local
¹ Polinosis (rinitis alérgica, asma bronquial)	Polen, restos de insectos o animales de compañía	Respiratoria	Edema e irritación de la mucosa nasal o bronquial
Alergia alimentaria	Leche, huevos, pescado, gluten	Digestiva	Vómitos, diarrea, prurito, urticaria

1.3.3.2. Hipersensibilización de tipo II

El organismo reacciona frente a alérgenos solubles pero unidos a las membranas celulares o a la matriz extracelular donde se genera ²neo-antígenos que son reconocidos por anticuerpos del tipo IgG. Los anticuerpos activan el complemento y reacciones de fagocitosis y citolisis celular. Así, se destruyen a las células que llevan unido al alérgeno.

Un ejemplo es la anemia hemolítica producida tras la administración de penicilina a alérgicos a la misma. Los síntomas pueden tardar varias horas tras la exposición al alérgeno.

¹ Se entiende por polinosis al trastorno alérgico ocasionado por el polen. En este trastorno alérgico el sistema inmunológico responde produciendo una gran cantidad de anticuerpo IgE ante la presencia de un alérgeno como si fuera una sustancia dañina que hay que eliminar.

² También llamados antígenos tumorales.

1.3.3.3. Hipersensibilidad del tipo III

El organismo reacciona frente a alérgenos solubles formándose inmunocomplejos con anticuerpos IgG; estos inmunocomplejos al depositarse causan reacciones inflamatorias locales activando también al complemento y provocando la destrucción de estos complejos por fagocitosis.

Un ejemplo es la alveolitis alérgica causada por alérgenos de ciertos hongos de la paja en agricultores (pulmón del granjero).

1.3.3.4. Hipersensibilidad del tipo IV

Está originada por la respuesta de linfocitos T, tanto frente a alérgenos solubles como asociados a células. El antígeno modifica las proteínas propias originando neo-antígenos que son reconocidas por los linfocitos T su re-exposición a los linfocitos T da lugar a una reacción de hipersensibilidad, llamada de tipo retardado, ya que tarda varios días en producirse y causa daños en tejidos debido a la secreción de citosinas inflamatorias o a procesos de citolisis.

Un ejemplo es la dermatitis por contacto causada por ciertos materiales metálicos como joyas, correas metálicas de relojes, etc.

1.4. Antecedentes bibliográficos

El interés por el polen para la comunidad científica puede valorarse mediante el número de publicaciones en revistas científicas. En este sentido, se pueden encontrar publicaciones relativas al polen antes de los años 80. El interés por su caracterización y su estudio ha ido aumentando con el paso de los años, tal como queda reflejado en la figura 16. En esta figura se observa un continuo aumento en el número de publicaciones científicas que hacen referencia o estudian el polen; cabe destacar el aumento observado entre los años 2003 - 2009; este incremento podría estar relacionado con el denominado el problema de colapso de colonias, detectado en USA en el año 2006 y el aumento del número de vehículos diesel con la consecuente acentuación de los casos de alergia (ver apartado 1.4.3)

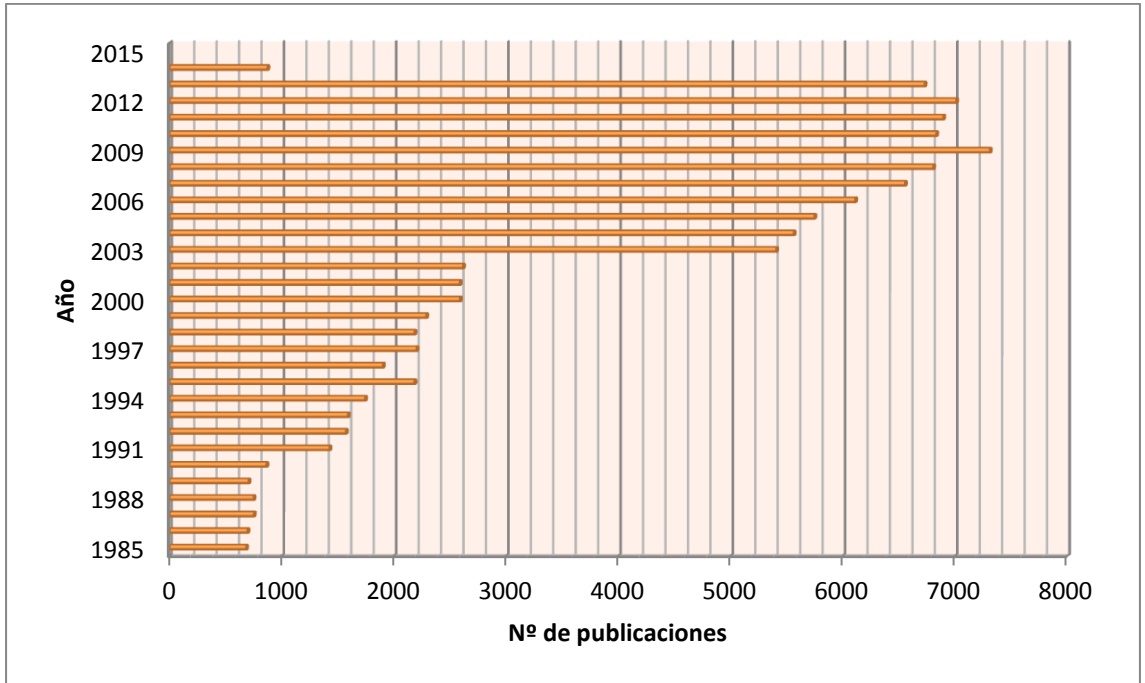


Figura 16. Publicaciones de polen desde el año 1985 hasta el año 2013 (WEB OF SCIENCE, consultado en abril de 2014)

Si bien es cierto que entre los años 2000-2010 eran estudios centrados en el área biológica, como son los estudios morfológicos en distintos pólenes, otras áreas de investigación han ido mostrando su interés en este tipo de muestra. En consecuencia, el polen podría considerarse como una muestra multidisciplinar, la cuál ha sido estudiada para alcanzar objetivos diversos.

Se definen cinco áreas de investigación diferentes, tales como:

- Ciencias Biológicas, que comprende entre otras disciplinas la bioquímica, genética, botánica, entomología, microbiología, micología, biología marina y zoología.
- Ciencias de la salud, que comprende el conjunto de disciplinas dedicadas a la adquisición de conocimientos para su aplicación en la promoción del bienestar físico, mental y social de los individuos y que entre otras se han considerado la medicina, farmacia, ciencias de la nutrición y veterinaria

- Ecología y medio ambiente, que aunque en un principio siempre ha estado unida a las ciencias biológicas, se han separado ambas disciplinas para hacer un estudio del estado del arte más exhaustivo.
- Ciencias Químicas, que incluyen la química en todas sus vertientes y la ciencia de los materiales.
- Otras áreas de investigación, donde se engloban las menos relacionadas con el polen, pero que han de tenerse en cuenta, debido a que se encuentran estudios interesantes. Dentro de este grupo se encuentran entre otras la geología y la paleontología.

Atendiendo a esta división, se han realizado la búsqueda del polen en las cinco áreas de investigación. El resultado se muestra en las figuras 17 y 18. En la figura 17 puede observarse que el área de investigación con más publicaciones científicas es el de las ciencias biológicas, con estudios morfológicos del polen y también inmunoestudios. Por el contrario, las ciencias químicas representan el área con menos publicaciones, en tanto por ciento, relativas al polen, con tal sólo un 1%. Esta observación se verifica en la figura 18, donde se representa el número de publicaciones en cada área de investigación, desglosadas por año. Cabe destacar la escasa aportación, atendiendo al número de publicaciones científicas del área de investigación en ciencias químicas, a pesar de que las técnicas más utilizadas sean probablemente las de la química analítica. En esta figura también puede observarse el aumento de publicaciones en las áreas diferenciadas.

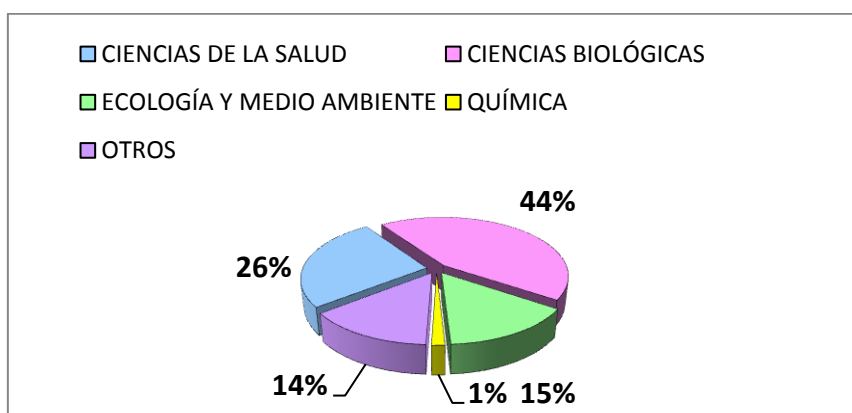


Figura 17. Número de publicaciones científicas del polen en función del área de investigación (WEB OF SCIENCE, enero 1985 - abril 2014)

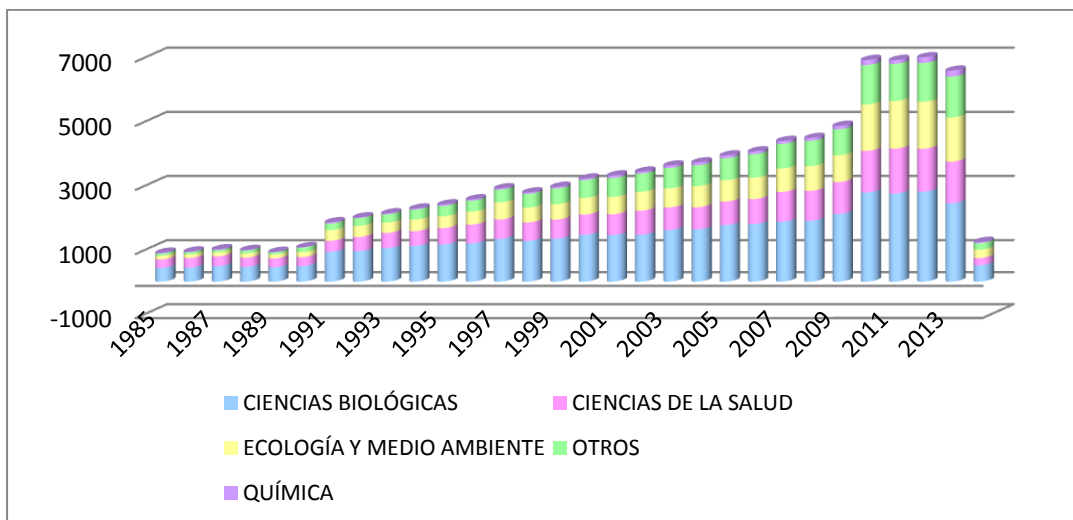


Figura 18. Número de publicaciones en cada área de investigación (WEB OF SCIENCE, 1985 - abril 2014)

Para poder observar de forma más clara la variación de publicaciones científicas por año dentro del área de investigación de la química, se ha representado de forma aislada en la figura 19 el número de publicaciones por año en la citada área de investigación. En esta figura se observa un aumento continuo de las publicaciones pero en ninguno de los casos llega a superar los 200 artículos.

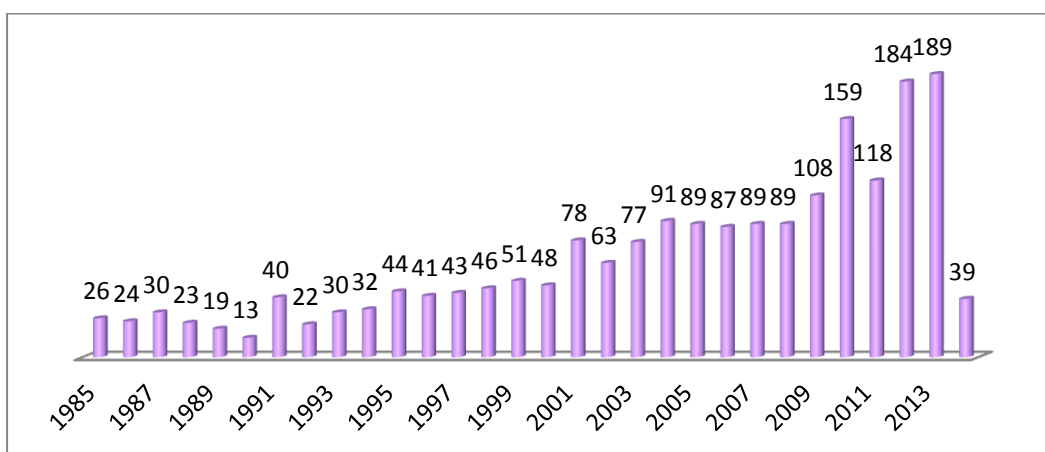


Figura 19. Número de publicaciones en el área de investigación de CC. Químicas (WEB OF SCIENCE, 1985 - abril 2014)

Por último y para concluir este estudio del estado del arte desde un punto de vista general, se han realizado dos estudios porcentuales dentro del área de investigación definido como el de Ciencias Químicas; el primero está representado en la figura 20 y muestra los objetivos buscados o tema de estudio más frecuente dentro de esta área y el segundo, representado en la figura 21, refleja las técnicas analíticas más frecuentes para alcanzar esos objetivos en el estudio del polen.

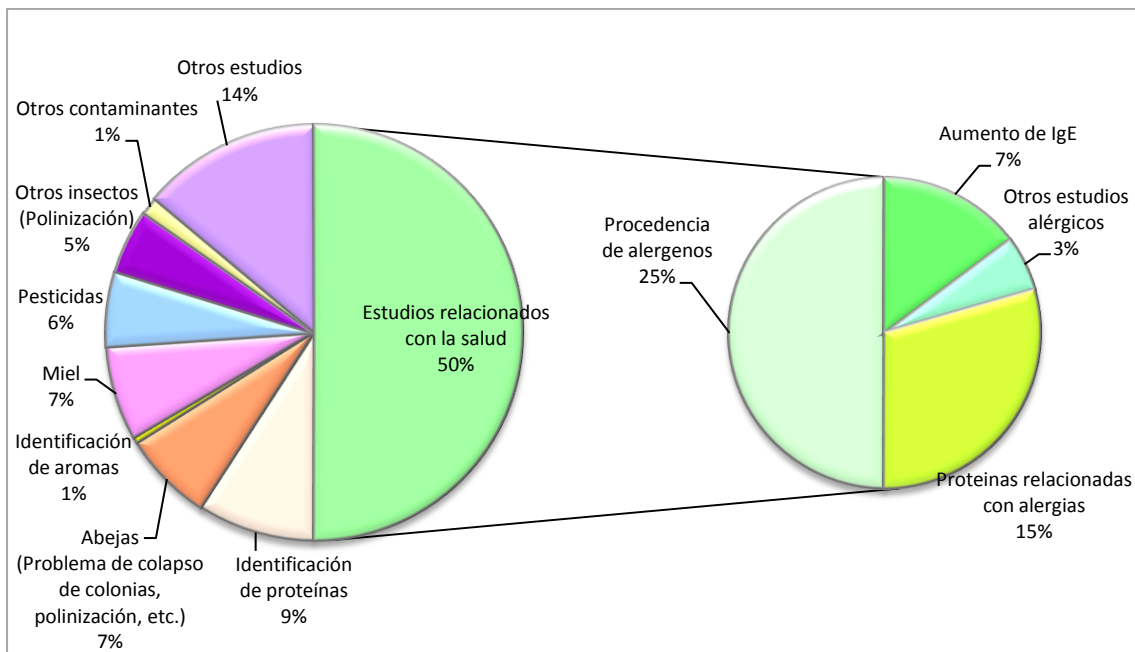


Figura 20. Estudio porcentual de los tipos objetivos científicos en polen dentro del área de investigación de CC Químicas (WEB OF SCIENCE, consultado en abril 2014)

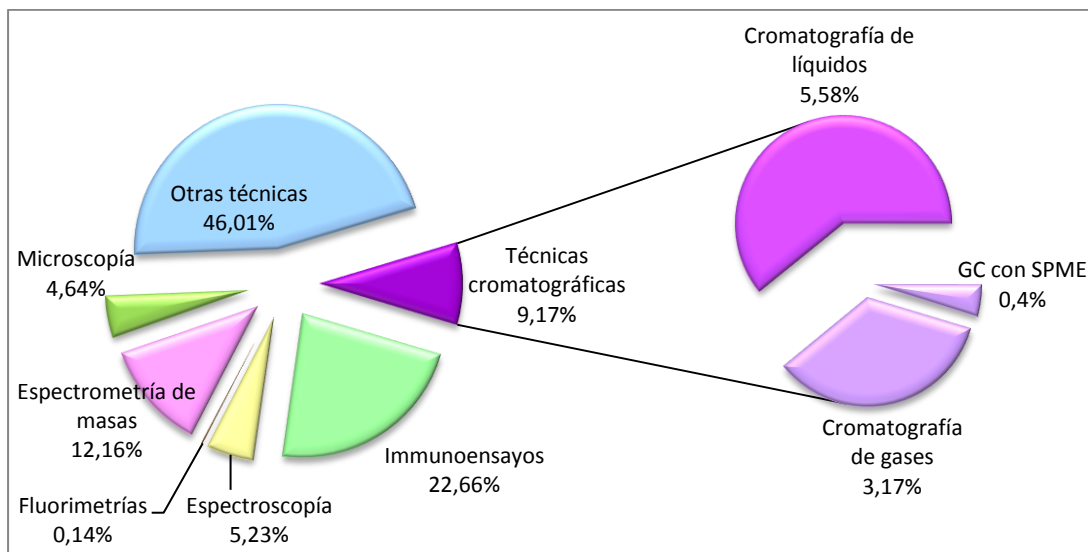


Figura 21. Estudio porcentual de las distintas técnicas analíticas dentro del área de investigación de CC Químicas (WEB OF SCIENCE, consultado en abril 2014)

1.4.1. Estudio del polen mediante técnicas cromatográficas

1.4.1.1. Introducción

Las técnicas cromatográficas son ampliamente conocidas y han sido utilizadas para la separación de compuestos para su determinación. En esencia consiste en la separación de compuestos que son arrastrados por una fase móvil a través de una fase estacionaria. La separación se produce gracias a que estos compuestos poseen una afinidad diferente por las fases móvil y estacionaria, detectándose a tiempos diferentes.

Se distinguen varios tipos de cromatografía en función del tipo de fase móvil y fase estacionaria, aunque todas ellas están basadas en el mismo principio. En la tabla 4 se describen algunos de los tipos.

Tabla 4. Tipos de cromatografía

Tipos	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel	Líquido	Papel de celulosa.
Cromatografía en capa fina	Líquido	Gel de sílice o alúmina.
Cromatografía de gases	Gas	Columnas capilares de sílice fundida, columnas empacadas con tierras diatomeas hechas de tubos de vidrio o metal.
Cromatografía líquida en fase reversa	Líquido (polar)	Empaques de siloxano de octilo o siloxano de octadecilo.
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (poco polar)	Empaques de sílice, alúmina o un soporte al que se unen químicamente grupos polares (ciano, amino, etc).
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Resinas de intercambio iónico.
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Empaques de pequeñas partículas de sílice o polímeros con red de poros uniforme.
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Partículas finamente divididas de sílice o de alúmina.
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Columnas abiertas de sílice fundida con recubrimientos internos de varios tipos de siloxanos enlazados y de enlaces cruzados.

1.4.1.2. Situación actual

Dentro de la diversidad de técnicas analíticas utilizadas para el análisis del polen, este apartado se centra en las técnicas cromatográficas, independientemente del objetivo y/o del área de investigación en que podría enmarcarse.

En las tablas 5 y 6 se muestran dos tablas bibliográficas de ensayos recientes, aproximadamente en los últimos tres años, en los que se han utilizado cromatografía de gases o líquidos, respectivamente, definiendo el área de investigación en el que podría enmarcarse, en función del objetivo perseguido.

En sendas tablas puede observarse como algunos de los objetivos perseguidos en las áreas definidas como Ciencias de la Salud y Ciencias Químicas son coincidentes (ej. contaminantes en alimentos). En esta revisión bibliográfica, los objetivos se han separado en cada área teniendo en cuenta las consideraciones de la base de datos Web of Science y según la revista en el que cada trabajo ha sido publicado.

Tabla 5. Estudio del polen mediante cromatografía de gases.

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
CC Salud	Determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados	ECD	SPE	Polen de abeja	9 OCPs y 10 OPPs	22
	Búsqueda de marcadores para identificación de origen botánico de la miel y clasificación del tipo de lavanda		Extracción S-L	Miel de Lavandin	VOCs de la miel	23
	Evaluación de calidad (composición y propiedades) de 10 mieles de trigo de sarraceno: VOCs miel	MS	SPME	Miel de trigo de sarraceno	VOCs de la miel	24
	Determinar si estos productos de origen vegetal son drogas		Extracción Sol-Liq (con EtOH y/o MeOH)	Jungle mystic incense, B-52, Blendz, Kratom 10x	Canabinoides y alcaloides	25
	Estudio de genotoxicidad de PAHs contenidos en partículas de aire mediante análisis de GCMS y "comet assay"		Colección de aire en filtros de cristal con fibra y posterior extracto orgánico	Partículas en aire		26

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Estudio sobre la composición química, origen botánico y actividad antioxidante del polen de abeja		Extracto etanólico y purificación con resina XAD2	Polen de abeja	Compuesto fenólicos y flavonoides	27
	Determinar si la fracción volátil del polen se ve afectada por el posterior tratamiento industrial		Dinamic-HS	Polen de abeja	VOCs	28
	Estudio de oxidación lípidica, decoloración y sabor correoso en el polen de abeja (loto) almacenado a distintas temperaturas		SPME	Polen de abeja	Oxidación de VOCs	29
	Estudio del contenido de lípidos en pólenes		Extracción S-L	Polen anemófilo (alergénico)	Lípidos	30
	Determinación de alcaloides pirrolidizidínicos (PAs) en estas mieles		Reacción de conversión del alcaloide al anillo común nicina	Mieles "antibacterianas"	PAs	31
	Determinación de micotoxinas en polen de abeja	MS/MS	QuECHERS	Polen de abeja	Micotoxinas	32

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Determinación de triterpenos	MS con ionización FID	Extracción S-L con hexano	Polen de abeja	Triterpenos	33
			Extracción L-L	Lamiaccae: aceite esencial	Compuestos orgánicos	34
	Identificación de composición química			Micromeria kernerii Murb. And M. juliana (L.) Benth. (Lamiaceae): Aceite esencial	Compuestos orgánicos	35
Biología	Estudio sobre la importancia de la exina, la antera y cuerpos "orbicules" en el desarrollo del polen y del tubo polínico	MS	Extracción S-L	Polen de arroz	abcg15 anther	36
	Estudio y comparación entre vegetales transgénicos y no transgénicos del trigo		Generación de plantas transgénicas. Obtención de metabolitos mediante tratamiento con Barnase	Trigo	Metabolitos genéticos	37

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Estudio de actividad polinizadora de insectos voladores con ciertos VOCs		Bombas aspiración	de Cono de la "falsa palmera" (cycad)	VOCs	38
	Conocimiento de rutas metabólicas durante la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico mediante el estudio del metaboloma y el transcriptoma		NA	Pollen de lilo	Estudios de más de 100 metabolitos	39
	Estudio e influencia en los polinizadores de J.Rotocea del contenido en VOC y de la composición de la flor		SPME	Jaborosa Rotacea (Solanaceae): VOCs	VOCs	40

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
Ecología y Medio Ambiente	Determinación y comparación entre la composición de aceite producido desde los tres componentes de la inflorescencia: pétalos, capullo y polen	MS	Obtención aceite mediante método de hidrodestilación	Dátil de la palmera masculina (inflorescencia compuesta por pétalos con muchos capullos que contienen el polen)	Composición química	41
	Determinación de residuos de pesticidas y de drogas veterinarias en dichas muestras mediante análisis multiresiduos		QuEChERS	abeja productora de miel, miel y polen de abeja procedente de 18 colmenas de distintos sitios de Francia	Pesticidas y/o residuos de drogas veterinarias (volátiles)	42
	Determinación de composición química y actividad antioxidante del pan de abeja		Extracto etanólico S-L	Pan de abeja	Composición química	43
CC Químicas	Obtención de perfil de VOCs	MS	HS-SPME	Miel, polen y flor de manzana roja	VOCs	44
			USE	Miel, polen y flor de manzana roja	VOCs	
	Análisis de VOCs y comparación entre miel y granos de polen		SPME	Miel de trigo de sarraceno y granos de polen de diferentes puntos geográficos	VOCs	45

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Estudio de recuperación de pesticidas organofosforados mediante extracción en fase sólida dispersiva (MSPD) usando dos sobrentes: sílica y titanio		MSPD extraction	Polen de abeja	Pesticidas organofosforados	46
	Estudios quimicotaxonómico y micromorfológico de estas plantas	FID MS	& Extracción Sol-Liq	Aceite esencial Satureja montana L. y S.Subpicata (Lamiaceae)	Composición química	47

Tabla 6. Estudio del polen mediante cromatografía de líquidos

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
CC Salud	Estudio sobre la composición química, origen botánico y actividad antioxidante del polen de abeja	UV-vis	Extracto etanólico y purificación con resina XAD3	Polen de abeja	Compuesto fenólicos y flavonoides	27
	Determinación de insecticidas del tipo neonicotinoides		QuEChERS y DLLME	Licor de miel (típico de Serbia)	Insecticidas neonicotinoides (como ej. Imidacloprid o AKD1022)	48
	Determinar si estos productos de origen vegetal son drogas	MS y/o	Extracción Sol-Liq (con EtOH y/o MeOH)	Jungle mistic B-52, Blendz, Kratom 10x	Canabinoides y alcaloides	25
	Determinación de pesticidas y metanolitos de pesticidas	MS/MS	QuEChERS	Polen de abeja	Pesticidas	49
	Determinación de surfactantes en productos de colmena		QuEChERS	productos de colmena: miel, cer y polen de abeja	nonylphenol ethoxylate y octylphenol ethoxylate surfacts	50

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Determinación de contenido en flavonoides (propiedades antioxidantes)		Extracción S-L	Pétalos y polen en las anteras de las flores de Agave durangensis	Flavonoides	51
	Determinación de alteración protéica por presencia de alergenitos en pacientes alérgicos		Digestión enzimática	Moco nasal de pacientes alérgicos	proteínas y alteraciones	52
	Determinación de nitración del alergenito Bet v del polen de abedul y su influencia en la respuesta alérgica		Reacción de nitración y digestión enzimática	Polen de abedul (birch)	Péptidos y sus nitrados	53
	Determinación de aflatoxinas y acrotoxinas en polen de abeja		Extracción sólido-líquido con ACN/Agua a bajas temperaturas Limpieza con clean up y columna de inmutioafinidad	Polen de abeja	Afaltoxinas y acorotoxinas	54

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Determinación y validación de un método para la determinación de alcaloide pirrolizidónicos en miel y hierbas culinarias	DAD	Extracción S-L	Miel	PAs	55
	Determinación de auxinas y "abscisic acid"		Extracto de MeOH y SPE	Rosa de te: Pétalos, polen , raíces, semillas	Auxinas y "abscisic acid"	56
	Evaluación de calidad (composición y propiedades) de 10 mieles de trigo de sarraceno: contenidos fenólicos		Extracción S-L	Miel de trigo de sarraceno	Perfil de contenido en fenólicos	24

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
Biología	Análisis de alinina en tomates transgénicos procedente del polen de tomate en disitntos estadios de germinación	MS	Tratamiento genético	Polen de tomate	aa transgénicos	57

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Determinación de fenol en los pólenes del género Zea	DAD TOF-MS	Extracción S-L?	Polen de 32 especies del género Zea	Compuestos fenólicos	58
	Estudios de varición del perfil fenólico en el polen de esas plantas	DAD	Extracción S-L ?	polen de 8 especies del género Agavaceae	Compuestos fenólicos	59
	Determinación de PAs		Extracción S-L	Aceite de semillas de Borago Officinalis	PAs	60
	Estudio farmacocinético de ciertos triterpenos del polen de Brassica en plasma de rata	MS MS/MS	y/o Extracción Líquido – Líquido	Plasma de rata	MET, DEH y NOR	61
CC Químicas	Determinación simultánea de 8 pesticidas neonicotinoides en polen		Extracción S-L	Polen de abeja o HFCS	Pesticidas neonicotinoides	62
	Determinación de polifeniles en polen de abeja	UV-vis		Polen de abeja	polifenoles	63
	Determinación de Glu, Cys y tioles totales en polen de pino	MS UV	Extracción S-L con buffer y derivatización con DTNB Y OPA	Polen de pino	Glu, Cys y tioles totales	64

Área de investigación	Objetivo	Técnica de detección	Preparación muestra	Muestra	Analito/Matriz	Ref
	Determinación del grado de nitración del alérgeno Bet v1 procedente del polen de abedul	DAD	Nitración y posterior digestión enzimática con tripsina	Polen de abedul (birch)	Péptidos y sus nitrados	65
	Determinación de flavonoides y IPNCC		Purificación	Pollen de Brassica	Flavonoides y IPNCC	66
Ecología y Medio Ambiente	Determinación de residuos de pesticidas y de drogas veterinarias en dichas muestras mediante análisis multiresiduos	MS/MS	QuECHERS	Abeja productora de miel, miel y polen de abeja procedente de 18 colmenas de distintos sitios de Francia	Pesticidas y/o residuos de drogas veterinarias (no volátiles)	42

1.4.2. Estudio del polen mediante microscopía electrónica

1.4.2.1. Introducción

La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez, están fuera del margen de resolución del ojo humano.

En 1655 fue desarrollado el primer microscopio compuesto por Robert Hooke (1635-1703). A partir de éste, los avances tecnológicos permitieron llegar a los modernos microscopios de nuestro tiempo, los que existen de varios tipos y son usados con diferentes fines. Hooke, utilizó un microscopio compuesto para estudiar cortes de corcho y describió los pequeños poros en forma de caja a los que él llamó "células". En realidad, Hooke había descubierto las células de la pared celular de los vegetales. En 1655 publica su libro *Micrographia*.

La microscopía óptica (*microscopía de luz clásica*), consiste en hacer pasar luz visible de una fuente (*difractada, reflejada o refractada en el sujeto de estudio*) a través de lentes ópticos simples o múltiples, para lograr una vista ampliada de la muestra. La imagen resultante puede ser detectada directamente por el ojo humano, impresa en una placa fotográfica o registrada y mostrada digitalmente. El límite de resolución del microscopio óptico es, aproximadamente, de unos 200 nm, el cual no es suficiente para observar orgánulos celulares, virus o macromoléculas de interés. Por tanto, la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible, que es de 4.000 Å aproximadamente. Sin embargo, el microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto; los electrones tienen una longitud de onda de 0.5 Å aproximadamente siendo mucho menor que la de la luz y permitiendo mostrar estructuras mucho más pequeñas.

Un microscopio óptico ordinario consta de una fuente de luz, un condensador para concentrar la luz sobre el objeto, un soporte para el objeto (portaobjetos o platina), una lente objetivo para concentrar la imagen y un ocular para proyectar la imagen formada por el objetivo sobre el ojo, o sobre una película fotográfica. Toda esta estructura es válida para el microscopio electrónico, con la diferencia de que la luz está reemplazada por un haz de

electrones, el soporte del objeto es una tela metálica (rejilla) y las lentes no son de vidrio sino que son electroimanes⁶⁷. Por último, el microscopio electrónico funciona a baja presión mientras que el óptico lo hace a presión atmosférica.

1.4.2.2. Técnicas de microscopía electrónica

Se distinguen dos principales técnicas:

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM) → Se observa a través del objeto (trans- iluminación). El objeto se corta en láminas ultrafinas (en el orden de nanómetros) que se colocan en una rejilla de cobre, la cual es bombardeada con un haz de electrones enfocado. Una silueta del espécimen se proyecta en una pantalla fluorescente o placa fotográfica situada por debajo del mismo. La resolución puede ser de 0,2nm.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM) → Se observa la superficie de un objeto sólido (epi-iluminación, sin cortar al objeto). Se puede lograr una resolución de 10nm y un aumento hasta de 20.000x. Se producen imágenes muy interesantes en 3D (tridimensionales) gracias a una mayor profundidad de campo. Se escanea la superficie del espécimen con un haz de electrones (primarios) y los electrones que rebotan (secundarios) son recogidos por un detector. La señal se observa en un monitor de televisión. Los átomos del espécimen producen rayos X que también son detectados por otro detector.

En la figura 22 se muestran ambas microscopías comparadas con la microscopía clásica.

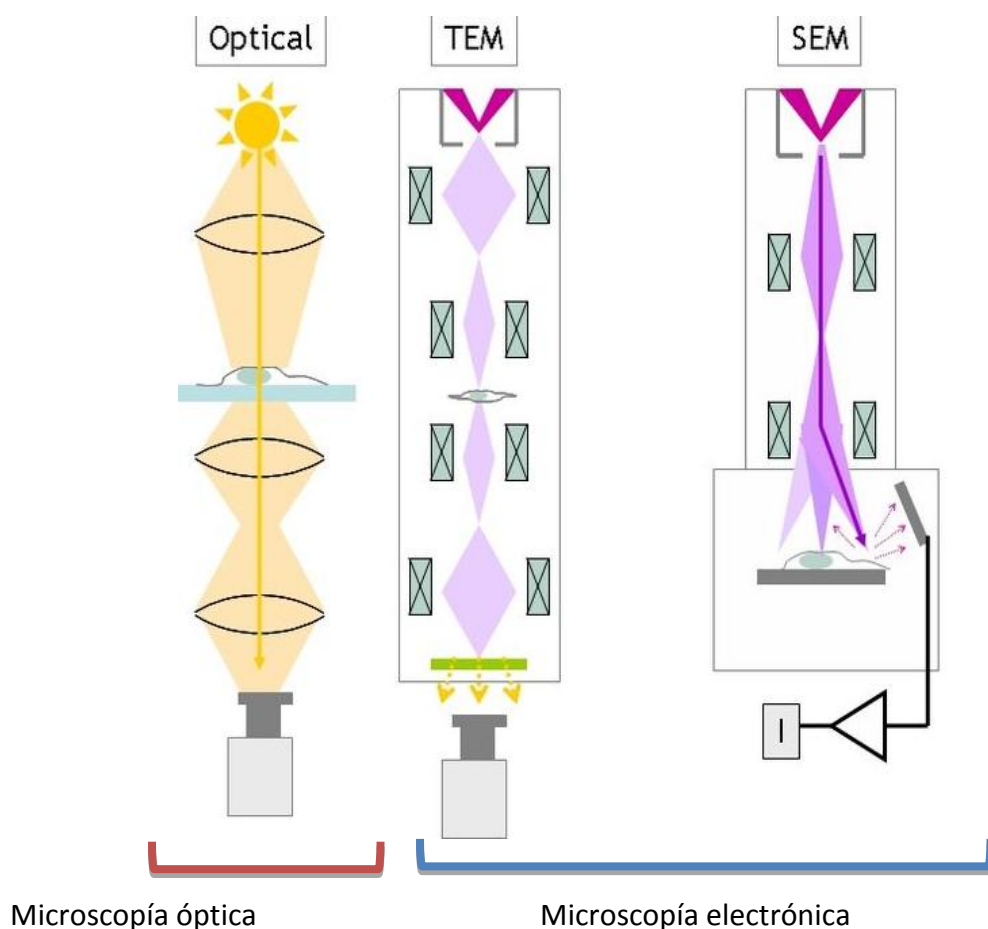


Figura 22. Microscopía óptica y microscopía electrónica

1.4.2.3. Situación actual

Dentro de la diversidad de técnicas analíticas utilizadas para el análisis del polen, este apartado se centra en las técnicas de microscopía electrónica, independientemente del objetivo y/o del área de investigación en que podría enmarcarse.

En la tabla 7 se muestra una revisión bibliográfica de ensayos recientes, en los que se ha utilizado dicha técnica, definiendo el área de investigación en el que podría enmarcarse, en función del objetivo perseguido.

Aunque es obvio, cabe destacar que la mayoría de las publicaciones revisadas en los últimos tres años están enmarcadas en el área de la Biología con el objetivo de describir la superficie.

Tabla 7. Bibliografía de estudios de polen y microscopía electrónica

Área de investigación	Objetivo	Muestra	Matriz/ Submuestra	Técnica microscópica	Otros datos	Ref.
Biología	Determinar expresión del gen causante desarrollo del tubo polínico y pistilo durante la fertilización	Brassica campestris	Pollen y pistilo	TEM y ensayos genéticos	Mediante microscopía electrónica y técnicas de tinción se descubrió una acumulación de material desconocido en el polen.	68 69
	Hibridación de granos de polen y determinación de diferencias mediante observación microscópica	Híbridos de Brassica carinnata y Brassica naptus	Polen y tubo polínico	TEM		70
		Salvia Quezelii (Lamiaceae)	Polen, hojas, corola, cáliz y tricomas	SEM		71
	Descripción morfológica	Orobanchae alsatica complex (orobanchaceae)	Polen y semillas	SEM		72
		Lilium	Granos maduros de polen	SEM y SEM con sputtering de oro		73
		12 especies de 5	Pólenes	SEM		74

Área de investigación	Objetivo	Muestra	Matriz/ Submuestra	Técnica microscópica	Otros datos	Ref.
	Descripción morfológica y valor taxonómico	géneros pertenecientes a la familia Asteraceae 33 especies del género Justicia (Jacobinia)	Pólenes	SEM		75
	Identificación de nuevas estructuras de la exina en Arabidopsis	Arabidopsis thaliana	Polen (exina) y células del tapete	TEM	La Arabidopsis thaliana fue la primera planta cuyo genoma fue secuenciado por completo (año 2000)	76
	Estudio del comportamiento en la transferencia de diatomeas de un escenario a la ropa de una víctima en un crimen, pudiendo ser evidencia trazable del lugar del hecho delictivo	Ropas y telas	Diatomeas	SEM	Estudia el grado de retención de las diatomeas en ropas, enmarcado dentro de la medicina forense	77
Ciencias de	Evaluación de los cambios	Células de	Parietaria	TEM		78

Área de investigación	Objetivo	Muestra	Matriz/ Submuestra	Técnica microscópica	Otros datos	Ref.
la salud	en las células de pulmón en presencia de alérgenos, PM10 y ambos simultáneamente	pulmón en presencia Parietaria officinalis y PM	officinalis y PM			
	Determinación del contenido de proteína en el polen de maíz y su capacidad alérgica en cerdos de guinea	Maíz (de la familia de Poaceae)	Polen Proteína alérgica del polen	SEM → Descripción morfológica de los granos de polen Inmunoensayos → Capacidad alérgica	Con la técnica de SEM no se consigue el objetivo planteado, pero es fundamental para identificar el tipo de polen a analizar (número de aperturas, tipo de exina, etc.). Otro estudio parecido a este se realizó en junio de 2013 con otro tipo de polen ⁷⁹	80
	Identificación de reguladores de crecimiento celular. La novedad de este trabajo reside en que los granos de polen son utilizados como sorbente	Frutas y vegetales	Reguladores de crecimiento vegetal	SEM → Descripción de morfología del sorbente SPE a base de granos de polen. HPLC-MS/MS → Identificación de		81

Área de investigación	Objetivo	Muestra	Matriz/ Submuestra	Técnica microscópica	Otros datos	Ref.
	de SPE (HILIC-SPE)			reguladores de crecimiento		
Ciencias Químicas	Identificación de si un polen encontrado es del Jurásico	Cycadopites	Polen	SEM y TEM	Dentro de la Paleontología	82
	Filogenia entre alnus eoceno y el actual	Fósiles cenozoico	Hojas y polen	SEM	Dentro de la Paleontología	83
Otros	Obtener sobre la dieta vegetal y poder hacer estudios similares en poblaciones antiguas	Chimpancés de África	Restos de polen en sarro dental	SEM-EDX	Dentro de la arqueología y relacionado con las ciencias de la salud. Utiliza SEM-EDX (Scanning electronic microscopy and Energy-dispersive X-ray)	84

1.4.3. Polinosis y contaminación

En el año 1819 el Dr. John Bostok lo definió por primera vez en su trabajo realizado para la Sociedad Médico-Quirúrgica de Londres, titulado "Un caso de una afección periódica de los ojos y el tórax". En él describía su propia enfermedad como un proceso catarral que solamente se produce durante la estación del heno en Inglaterra y lo denominó "fiebre del heno". Nueve años más tarde, el Dr. Bostok leyó un estudio que incluía 18 casos más idénticos al suyo⁸⁵.

En los años 50, se registran las primeras publicaciones científicas donde de una forma discreta, se relaciona la problemática del aire contaminado con la salud y, concretamente, con los casos de alergia^{86, 87}

En 1963, Veikko Pirilä y colaboradores publicaron un estudio en el que constataban los graves problemas de salud debido a la contaminación atmosférica y, además, relacionaba directamente la contaminación del aire en países europeos con casos alérgicos en los meses de invierno. Estos casos no eran los habituales estudiados como la fiebre del heno, sucedidos en la estación de primavera.

Que la contaminación atmosférica genera graves problemas de salud es un hecho indiscutible, probado científicamente a lo largo de los años ^{88, 89, 90, 91, 92, 93}. En adición, actualmente es muy conocido el efecto sinérgico que la contaminación provoca en los casos alérgicos ^{94, 95, 96, 97, 98, 99}. Numerosos estudios demuestran que existe una relación amplificadora entre la polución, y en concreto los denominados DEP ("*Diesel Exhaust Particle*"), el ozono y óxidos de nitrógeno (NOx), y las reacciones alérgicas ^{100, 101, 102, 103, 104, 105}. Sin embargo, no se dispone de antecedentes del estudio de VOC procedentes de tubos de combustión cuando el vehículo está en movimiento.

Numerosos estudios inmunológicos han demostrado que la concentración del anticuerpo IgE es mayor en presencia de polen + DEP que con alérgeno de polen exclusivamente. En concreto, son muy utilizados los ensayos de inmunotinción o inmunomarcación, término general en bioquímica que se aplica a cualquier uso de un anticuerpo basada en métodos para detectar una proteína en una muestra. Como por ejemplo, el **enzimoinmunoensayo o método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent**

assay), que permite identificar inmunocomplejos por medio de enzimas unidas al antígeno o anticuerpo, estando uno de ellos adsorbido a un soporte sólido, generalmente una placa de poliestireno. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la utilización de una enzima conjugada químicamente al antígeno o anticuerpo. La enzima convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado, tras añadir un sustrato apropiado, cuyo color es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados¹⁰⁶. En la figura 23 se muestra el método ELISA directo e indirecto. En el directo, el antígeno es detectado por un anticuerpo específico (1); este anticuerpo está conjugado con una enzima de anclaje (2); a través del sustrato que se une a la enzima se puede cuantificar ya que: $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P_{\text{coloreado}}$ (3). En el indirecto, el antígeno reacciona específicamente con el anticuerpo (1'); el complejo antígeno-anticuerpo es detectado por un segundo anticuerpo conjugado con una enzima que reconoce dominios constantes del primer anticuerpo (2'); a través del sustrato que se une a la enzima se puede cuantificar ya que se cumple la reacción detallada en el caso anterior (3')¹⁰⁷. Utilizando estas técnicas de inmunotinción en células de pulmón sometidas a partículas de diesel (PM₁₀¹⁰⁸) y polen alergénico junto con estas partículas, se ha podido concluir que cuando la exposición es de ambas partículas se produce un aumento de IL4 e IL13 todas sustancias relacionadas con la producción de IgE y, por tanto, relacionadas con la respuesta alérgica de tipo inflamatorio (ver apartado 1.3.3.1)¹⁰⁹.

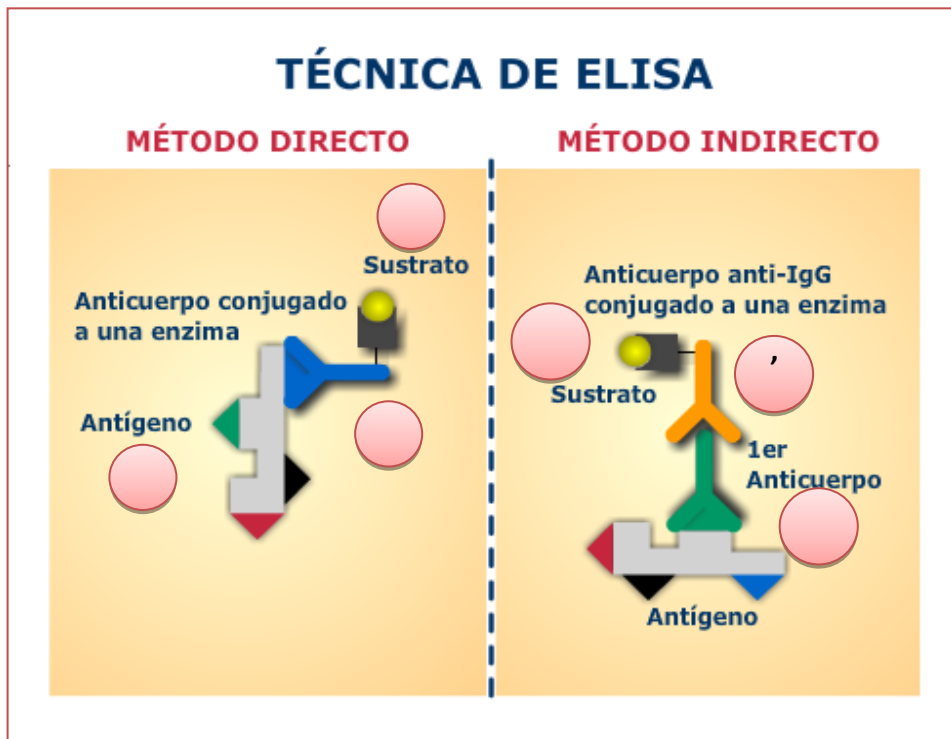


Figura 23. Método ELISA directo e indirecto.

Otros estudios de tipo estadístico ponen en evidencia el aumento de sintomatología clínica de hipersensibilidad de tipo I en ambientes contaminados, como por ejemplo en hogares con fumadores, o con la presencia de otros alérgenos distintos al polen, como por ejemplo mascotas o con hogares con humedades relativas elevadas (siendo especialmente importante en alergias a ácaros) **110**

Por tanto, la mayoría de los ensayos en este campo son inmunoensayos, enfocados a determinar el comportamiento del sistema inmune en presencia de ambos factores.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO DEL TRABAJO

2. Objetivo del trabajo

Es un hecho ampliamente aceptado el interés creciente de la comunidad científica por el estudio del polen, planteándose diferentes objetivos, enmarcados en distintas áreas de investigación. La revisión bibliográfica realizada en el capítulo anterior ha puesto de manifiesto la escasa información existente dentro del área de la química. Las investigaciones realizadas en esta área podrían aportar datos valiosos a otras áreas, tales como la medicina, biología o medio ambiente. Concretamente, se han encontrado numerosos trabajos en los que se demuestra el efecto sinérgico de la contaminación sobre los episodios alérgicos, y por parte de las partículas de motores diesel, proponiéndose un efecto sensibilizador del sistema inmune por dicha contaminación. Por otra parte, numerosas investigaciones han aportado datos relevantes sobre el papel del polen como portador de ciertos pesticidas, pudiendo ser causante de efectos colaterales como el acusado “efecto de colonias” en las abejas, explicando su decrecimiento en la población.

En el trabajo presentado en esta tesis doctoral se han seleccionado a 11 pólenes, 8 de los cuales son los más abundantes en la atmósfera de la Comunidad Autónoma de Madrid, y tiene como objetivo principal el estudio del polen en su doble vertiente, como:

1. Adsorbentes de compuestos volátiles contaminantes. Se han realizado análisis mediante HS-SPME-GCMS, con diversas fibras disponibles en el mercado, para la identificación y semi-cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en los pólenes, identificando los contaminantes y en especial los relacionados con los gases de combustión procedentes de vehículos.
2. Portadores de partículas sólidas contaminantes adheridas en su superficie. Se han realizado análisis mediante SEM para obtener información morfológica y composición elemental de los pólenes estudiados, en el margen (200nm -500µm) y detectar la posible presencia de partículas exógenas al polen.

A partir de este objetivo principal se derivan los siguientes objetivos transversales:

1. Estudios mediante GCMS:
 - a. Simplificación de la optimización de las condiciones experimentales de SPME empleando la herramienta estadística de diseño factorial.
 - b. Empleo de la herramienta estadística de análisis de componentes principales para el estudio del comportamiento de las fibras frente a los VOCs, ateniendo principalmente al número y naturaleza de VOCs retenidos
 - c. Identificación de los VOCs presente en cada polen.
 - d. Identificación de los VOCs emitidos por los tubos de combustión de vehículos en movimiento, con motores diesel y gasolina.
2. Estudios mediante SEM:
 - a. Descripción morfológica de la exina de los pólenes estudiados.
 - b. Efecto de las condiciones de temperatura aplicadas en SPME sobre la exina.
 - c. Efecto sobre la exina de disolventes orgánicos polares.
 - d. Morfología de las partículas procedentes de los tubos de combustión de vehículos con motores diesel y gasolina.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte experimental

Se realiza el estudio de los pólenes disponibles mediante dos técnicas: SPME-GCMS y Microscopía electrónica SEM, y de los VOCs procedentes del tubo de combustión de vehículos en marcha mediante SPME-GCMS, según se describe en la figura 24. En consecuencia, este apartado se estructura de acuerdo con el esquema presentado en esta figura 24.

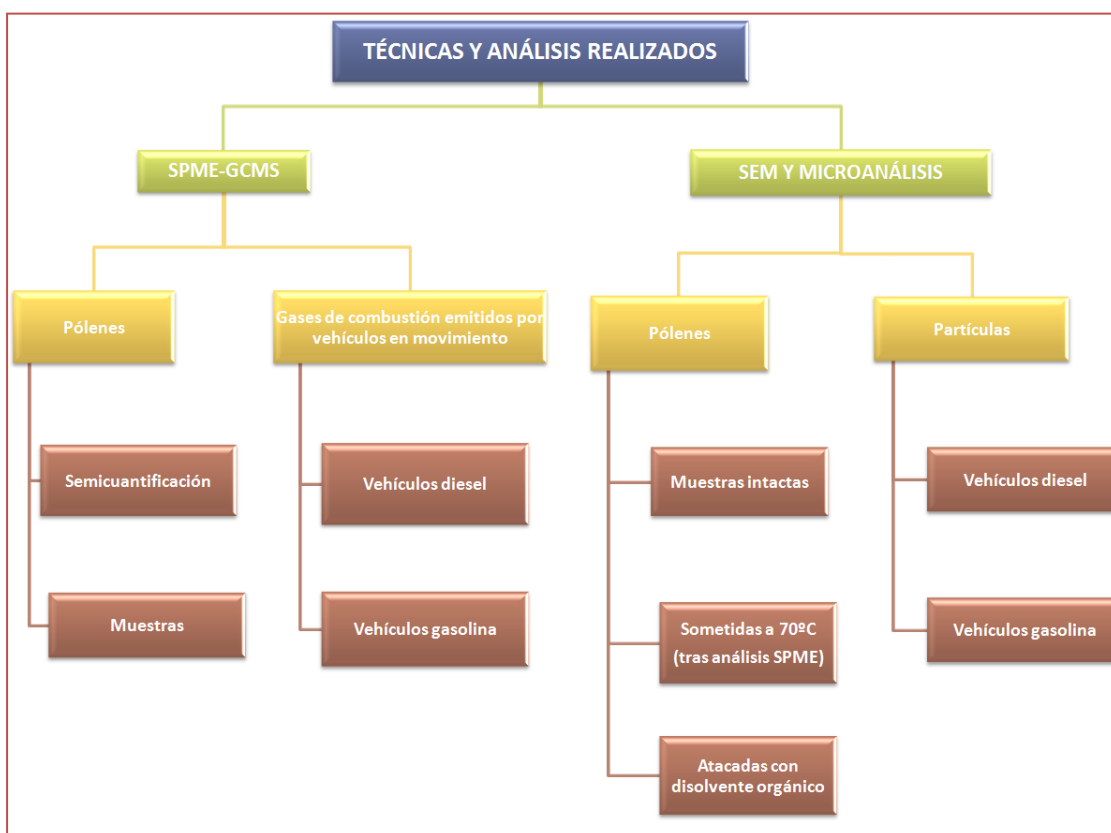


Figura 24. Estructuración del trabajo por técnicas utilizadas

3.1. Análisis mediante SPME-GCMS

3.1.1. Equipos y material

- **GCMS:** El espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo de gases dispone de una fuente de ionización electrónica y de un analizador tipo cuadrupolo. El cromatógrafo de gases cuenta con un inyector automático “Multifiber Change” que permite realizar extracciones automáticas hasta con tres fibras. En la tabla 8 se describe dicho equipo. El gas de arrastre fue Helio calidad Premier de Carburos Metálicos, con contenidos en O₂ menores de 1 ppm, en H₂O menores de 2 ppm, en N₂ menores de 0.5 ppm y en hidrocarburos totales como CH₄ menores de 0,5 ppm. La columna cromatográfica utilizada fue VA624, 5% diphenyl-95%dimethyl polysiloxane (60 m x 0.25 mm I.D., 1 µm) de VARIAN. El software para la obtención y tratamiento de datos fue el ChemStation version 2.0d, 2005.

Tabla 8. GCMS

Código interno	Equipo	Casa Comercial	Modelo
EQ 04345H0 EP-11-01	Espectrómetro de masas	AGILENT TECHNOLOGIES	5975C
EQ 04345H0 EP-11-02	Cromatógrafo de gases	AGILENT TECHNOLOGIES	7890A
EQ 04345H0 EP-11-03	Inyector automático-Multifiber Change	GERSTEL	MPS2XL

- Fibras SPME de SUPELCO, descritas en la tabla 9
- Sistema de acondicionamiento y limpieza de fibras (NURKA®390 Fiber Conditioning)
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.00001 g Mettler Toledo. Modelo AX105 DR, calibrada en diciembre 2014 por Mettler Toledo, laboratorio acreditado por ENAC, con frecuencia de calibración cada dos años.
- Portafibras (Holder) de SPME para cromatografía de gases para inyección manual y automática, Supelco.
- Viales de 20 mL para HS-SPME con cápsula de rosca de aluminio y septum de PTFE. SIGMA ALDRICH
- Matraces aforados de 1 y 2 mL, clase A de Scharlau
- Pipeta Eppendorf Research de 0,5-2,5 µL

- Holder metálico para contener la fibra para la toma de muestra en tubos de combustión, Nurka. Este dispositivo consta de una red metálica para proteger la fibra y una abrazadera adaptable para diferentes diámetros de tubos de combustión (Figura 25)
- Ultrasonidos, P-Selecta
- Programa estadístico StatGraphics Plus 5.1 para la obtención de resultados de diseño factorial y análisis de componentes principales.



Figura 25. Holder metálico de la fibra para tubos de combustión (Nurka)

Tabla 9. Fibras SPME empeladas.

¹ Código color	Fase estacionaria / espesor	T ^a _{máx} , °C	Polaridad	Uso
Polidimetilsiloxano (PDMS)				
Rojo	100µm, fase no enlazada	280	No polar	GC/HPLC
Amarillo	30 µm, fase no enlazada	280	No polar	GC/HPLC
Verde	7 µm, fase enlazada	240	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)				
Marrón	60 µm, fase parcialmente entrecruzada	2270	polar	GC
		270	Bipolar	HPLC
Azul	65 µm, fase parcialmente entrecruzada	270	Bipolar	GC
Rosa	65 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)			
Poliacrilato (PA)				
Blanco	85 µm, fase parcialmente entrecruzada	220	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)				
Negro	75 µm, fase parcialmente entrecruzada	320	Bipolar	GC
Azul Claro	85 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB)				
Amarillo-verde	70 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
	65 µm, fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)				
Naranja	50 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)				
Gris	50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
Gris con muesca	50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC
Polietilen glicol (PEG)				
Violeta claro	60 µm, fase no enlazada	245 °C	Polar	GC

¹ A partir de ahora se nombran las fibras con el código de color expuesto en esta tabla.

3.1.2. Reactivos

En la tabla 10 se describen los disolventes orgánicos utilizados en la preparación de una mezcla de volátiles para la semicuantificación de los VOCs en muestras de polen.

Tabla 10. Mezcla de VOCs para semicuantificación

Disolvente	Referencia	Lote	Casa comercial
Alcohol bencílico-100mL	402834-100mL	SHBD3463V	Sigma Aldrich
Tolueno-1L	To0082	34575/1449	Scharlau
n-Octadecano-100mg	44-2697	LCO2328V	Supelco
Diclorometano-2.5L	CLO0352300	12978801	Scharlau
Hexano-1L	32293	SZBE0140V	Sigma Aldrich

3.1.3. Muestras

3.1.3.1. Pólenes

En la tabla 11 se especifican los once pólenes analizados, la referencia y su proveedor. Todos los pólenes se han conservado a temperatura en un intervalo comprendido entre (2-6) °C.

Tabla 11. Muestras de polen

Polen	¹ Nombre de muestra	Casa comercial
Polen de árbol del Betula nigra (abedul de agua)	Birch	Allergon AB (origen suizo)
Polen de hierba del Secale Cereale	Grass	
Sorghum Halapense	Halapense	
Ulmus Scabra	Olmo	
Platanus orientalis	Plátano	
Quercus alba	Quercus	
Poaceae Poa pratensis	Poa	

¹ En adelante se nombrarán según con está nomenclatura.

Polen	¹ Nombre de muestra	Casa comercial
Fraxinus excelsior	Fraxinius	
Olea europea	Olivo	
Populus alba	Populus	Sigma Aldrich
Cruspeaceae/Taxaceae	Arizónica	(origen estadounidense)
Cupressus Arizonica		

3.1.3.2. Gases de combustión emitidos por vehículos

En la tabla 12 se identifican los vehículos utilizados para el análisis de VOCs de sus gases de combustión.

Tabla 12. Vehículos

¹ Muestra de la muestra	Marca	Modelo	Año de matriculación	Kilometraje, km	Combustible
V1	Volkswagen	Polo	2000	308.089	Gasolina
V2	Volkswagen	Polo	2010	117.279	Gasoil
V3	Volkswagen	Pasat	2000	272.051	Gasoil
V4	Ford	Focus	2000	69.720	Gasolina

3.1.4. Procedimientos

3.1.4.1. Acondicionamiento de fibras SPME

Las fibras utilizadas para la extracción de volátiles fueron las descritas en la tabla 9. Todas ellas fueron acondicionadas previamente en el dispositivo NURKA®390 Fiber Activator, pasando una corriente de nitrógeno a 20mL/min durante 20 minutos a la temperatura recomendada por el fabricante en función de la fase estacionaria de la fibra.

¹ En adelante se nombrarán según con esta nomenclatura.

3.1.4.2. Condiciones de análisis mediante GCMS

La temperatura del inyector del cromatógrafo de gases fue de 240°C, en modo splitless durante 5 minutos. El programa de temperatura en el horno cromatográfico fue el siguiente: en 40°C durante 15 minutos, a continuación, una rampa de 3°C/min hasta 60°C que se mantiene durante 1 minuto, seguida de una rampa 5°C/min hasta 160°C durante 1 minuto y otra de 10°C/min hasta 240°C que se mantiene durante 11,3 minutos. El tiempo total de análisis fue de 63 minutos.

Las temperaturas de la fuente de ionización del espectrómetro de masas y de la interfase fueron de 230°C y 280°C, respectivamente. La detección mediante espectrometría de masas fue realizada en modo SCAN en el margen de masa comprendido entre 25-650 m/z.

3.1.4.3. Análisis de pólenes

3.1.4.3.1. Preparación de la mezcla de VOCs para la semicuantificación (MIX-VOCs)

- **Disolución stock 1000 ppm:** Se preparan dos disoluciones stock de 1000 ppm de concentración de alcohol bencílico y n-octadecano en disolución diclorometano:hexano (1:1) (DCM:HX, en adelante), respectivamente. Para ello, en dos matraces aforados de 2 mL se añaden 1.99 mg de n-octadecano y 1.9 µL de alcohol bencílico, respectivamente, se enrasan con disolución DCM:HX y se agitan 3 minutos en ultrasonidos, conservándose a 4°C aproximadamente hasta su uso.
- **Disolución MIX-VOCs:** Se prepara una disolución en DMC:HX que contiene 10, 100 y 100 ppm de tolueno, alcohol bencílico y n-octadecano, respectivamente. Para ello, a un matraz aforado de 1 mL se añaden 100 µL de la disolución stock de 1000 ppm de alcohol bencílico, 100 µL de la disolución stock de 1000 ppm de n-octadecano y 1,15 µL tolueno, enrasándose con disolvente DCM:HX. La mezcla resultante se agita en ultrasonidos durante 5 minutos y se conserva a 4°C aproximadamente hasta su uso.

3.1.4.3.2. Preparación de muestras de polen

Se pesan exactamente unos 20 mg de cada polen en la balanza analítica de precisión y se introducen en un vial de SPME de 20 mL con tapón de rosca y septum de PTFE. Los viales se sitúan en la gradilla del inyector automático del GCMS y se procede a la extracción automática mediante SPME. En la tabla 13 se incluyen las masas de cada muestra para realizar el análisis con cada fibra de SPME.

Tabla 13. Masas de las muestras de polen para análisis mediante HS-SPME-GCMS.

		Fibra SPME (ver tabla 9)							
		Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul Clara
Masas de pólenes, mg	Birch	20,65	20,30	20,31	21,11	20,78	21,02	20,17	20,31
	Grass	21,15	21,31	19,86	20,94	21,33	20,37	20,60	24,03
	Halapense	20,41	24,12	21,46	20,39	20,81	20,74	20,91	21,52
	Olmo	20,13	20,31	20,39	21,31	20,34	20,71	20,45	23,61
	Plátano	20,85	20,17	23,61	20,95	19,73	19,83	20,67	20,19
	Poa	22,32	19,94	20,94	23,15	22,31	20,65	20,39	20,56
	Quercus	21,12	20,63	20,36	21,30	21,46	21,59	20,46	20,99
	Fraxinius	20,91	20,49	20,84	22,90	21,54	20,38	19,71	23,21
	Olivo	21,09	20,19	20,37	20,36	20,35	20,37	19,33	23,12
	Populus	21,41	20,71	20,39	20,72	20,69	22,41	19,99	22,22
	Arizónica	20,38	21,38	21,65	20,76	20,89	21,83	22,37	20,19

3.1.4.3.3. Preparación de muestras de polen enriquecidas para la semicuantificación de VOCs

En 8 viales de SPME de 20 mL con tampón de rosca y septum de PTFE, se pesaron exactamente unos 20 mg del polen Sorghum Halapense con balanza analítica (tabla 14). En cada vial y sobre el polen pesado, se añadió 1 µL de MIX-VOCs. Los viales se colocan en la gradilla del inyector automático del GCMS y se procede a la extracción automática mediante SPME.

Tabla 14. Masas de las muestras enriquecidas con MIX VOCs para la cuantificación de VOCs en polen *Sorghum Halapense*

	Fibra SPME (ver tabla 9)							
	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul Clara
Masa Halapense, mg	20,84	20,43	19,99	20,52	20,38	21,78	20,22	20,17

3.1.4.3.4. Extracción mediante HS-SPME

Las ocho fibras utilizadas fueron las descritas en la tabla 9 previamente acondicionadas según se describe en el apartado 3.1.4.1. La extracción de los VOCs del polen se realizó en modo automático, a una temperatura de 70°C, durante 60 minutos y con una agitación de 250 rpm. La desorción térmica de los analitos retenidos en la fibra se efectuó en el interior del inyector del cromatógrafo de gases y se realizó el análisis mediante GCMS con las condiciones detalladas en apartado III.8.

3.1.4.3.5. Semicuantificación de VOCs

La mezcla MIX-VOCs que contiene tolueno, alcohol bencílico y n-octadecano se empleó para semicuantificar los VOCs identificados previamente según el apartado 3.1.4.5. El contenido endógeno de tolueno, alcohol bencílico y n-octadecano se determinó restando la cantidad añadida a las muestras enriquecidas.

3.1.4.4. Análisis de gases de combustión

A los tubos de combustión de los vehículos descritos en la tabla 12, se les incorporó el holder diseñado para este fin, descrito en el apartado 3.1.1, que contenía una fibra previamente acondicionada tal y como se visualiza en la figura 25. La fibra utilizada fue la codificada como azul clara (tabla 9).

Los vehículos recorrieron el mismo circuito de 3 km de distancia, manteniendo revoluciones del motor entre 2000 – 2500 rpm.

La desorción térmica de los analitos extraídos fue llevada a cabo en el interior del inyector del cromatógrafo de gases en las condiciones descritas en el apartado 3.1.4.2.

3.1.4.5. Identificación de VOCs

Los VOCs separados fueron identificados de modo manual mediante comparación de su espectro de masas con los disponibles en la base de datos de la librería NIST, versión 2.0d edición 2005. La identificación manual se basó en obtener un factor de concordancia superior al 70%, en el pico molecular y por comparación de tiempo de retención entre todos los pólenes.

3.2. Análisis mediante microscopio SEM

Los análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron realizados en el laboratorio del Centro de Asistencia Tecnológica de microscopía (CAT) de la Universidad Rey Juan Carlos I de Madrid.

3.2.1. Equipos, material y reactivos

- **SEM:** Microscopio electrónico de barrido modelo XL30 ESEM de PHILIPS (XL SERIES).
- Equipo de preparación de muestra para análisis mediante SEM en régimen de alto vacío: Casa comercial BAL-TEC, modelo SCD005.
- Soporte: Aluminio con adhesivo de grafito.
- Estufa P-selecta, modelo Digitronic.
- Vortex Biogen Científica, modelo Unimax ZX.
- Viales de vidrio de 10 mL.
- Pipetas de vidrio Paster.
- Acetona, Scharlau.

3.2.2. Muestras

3.2.2.1. Polen

Las muestras de polen analizadas fueron las descritas en la tabla 11.

3.2.2.2. Partículas procedentes de vehículos

Las partículas analizadas fueron las recogidas de los tubos de combustión de los vehículos denominados como V3 y V4 (tabla 12).

3.2.3. Procedimientos

3.2.3.1. Pólenes

Se prepararon las muestras de polen obtenidas directamente del vial original y se analizaron en dos modalidades:

- **En régimen ambiental:** Este régimen fue aplicado a todos los pólenes. En esta modalidad, una punta de espátula de polen se espolvorea sobre el soporte que va adherido en la gradilla. Las imágenes se obtuvieron con un detector GSE. En este modo se obtienen los resultados de análisis elemental.
- **En régimen de alto vacío:** Esta modalidad fue aplicada sólo a aquellos pólenes que en régimen ambiental no se resolvía correctamente la morfología de la exina. En esta modalidad una punta de espátula de polen se espolvorea sobre el soporte y se realiza un Sputtering de oro, depositándose una capa nanométrica de dicho metal en la superficie de la muestra haciéndola más conductora. Las imágenes obtenidas con detector SE son más nítidas que en la modalidad anterior, pero no es posible realizar un microanálisis ya que el oro apantalla los resultados de los demás elementos presente en el polen.

3.2.3.2. Pólenes sometidos a 70°C

Se transfiere una punta de espátula de los pólenes Halapense, Arizónica, Olivo y Plátano a viales de vidrio de 10 mL y se introducen en una estufa a 70 °C durante 1 hora (mismas condiciones que la extracción SPME). A continuación, se realiza el mismo tratamiento que en régimen de alto vacío, detallado en el apartado 3.2.3.1.

3.2.3.3. Pólenes tratados con disolvente orgánico

Se transfiere una punta de espátula de los pólenes Halapense, Arizónica, Olivo y Plátano a viales de vidrio de 10 mL y se añade una cantidad de acetona suficiente como para cubrir el polen. A continuación, se agitan en vortex durante 30 segundos aproximadamente y se dejan secar a temperatura ambiente.

El residuo de polen obtenido se prepara en la modalidad de régimen de alto vacío.

3.2.3.4. Partículas procedentes de vehículos

Las partículas procedentes de los tubos de combustión de los vehículos V3 y V4 se analizarán en la modalidad de régimen ambiental.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y Discusión

Se realiza el estudio de los pólenes disponibles mediante dos técnicas: GCMS y SEM, según se describe en la figura 24. En consecuencia, este apartado se divide en dos partes, una para cada técnica.

En cada muestra analizada mediante GCMS, ya sea de polen o de gases de combustión procedente de vehículos, se obtienen elevado número de compuestos orgánicos identificados. Para facilitar la obtención de conclusiones se ha realizado una clasificación de los compuestos detectados, en función de su grupo funcional principal, según se describe en la figura 26. Se señala en rojo el tipo de compuestos que se asignan a los VOCs identificados en las muestras analizadas.

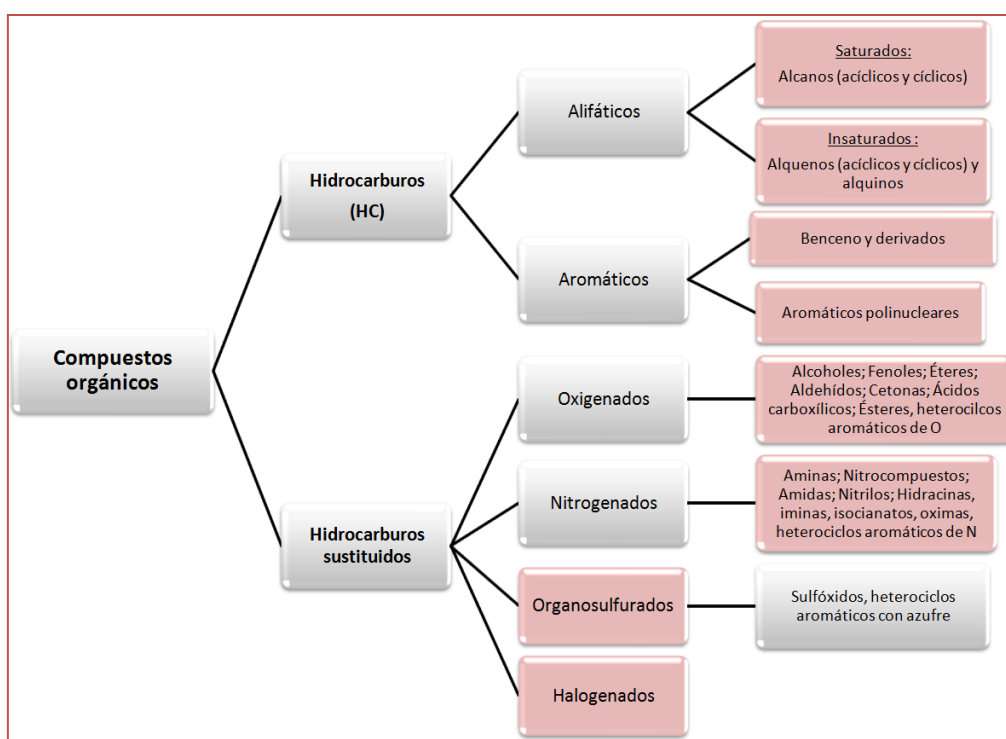


Figura 26. Clasificación de compuestos orgánicos según su grupo funcional

Cuando el compuesto detectado tiene 2 o más grupos funcionales, se ha clasificado según la prioridad de grupos funcionales que se muestra en la figura 27 y de acuerdo con los criterios que se establecen a continuación:

- i. Cuando un compuesto tiene un grupo funcional unido directamente a un anillo bencénico será clasificado como “derivado de benceno”. Por tanto, el benzaldehído se clasificará como derivado de benceno, mientras que el fenilacetaldehído se asignará como aldehído. Este criterio se aplicará siempre con dos excepciones:
 - El alcohol bencílico se considera como derivado de benceno ya que es el primer alcohol aromático.
 - Cuando un anillo bencénico tenga unido dos grupos funcionales iguales, se clasifica según el grupo funcional, como por ejemplo los ftalatos, clasificados como éster.
- ii. Las lactonas son ésteres cíclicos; por tanto, para simplificar la clasificación se engloban dentro del grupo de “ésteres”.
- iii. Las lactamas son amidas cíclicas; por tanto, para simplificar la clasificación se engloban dentro del grupo “amidas”

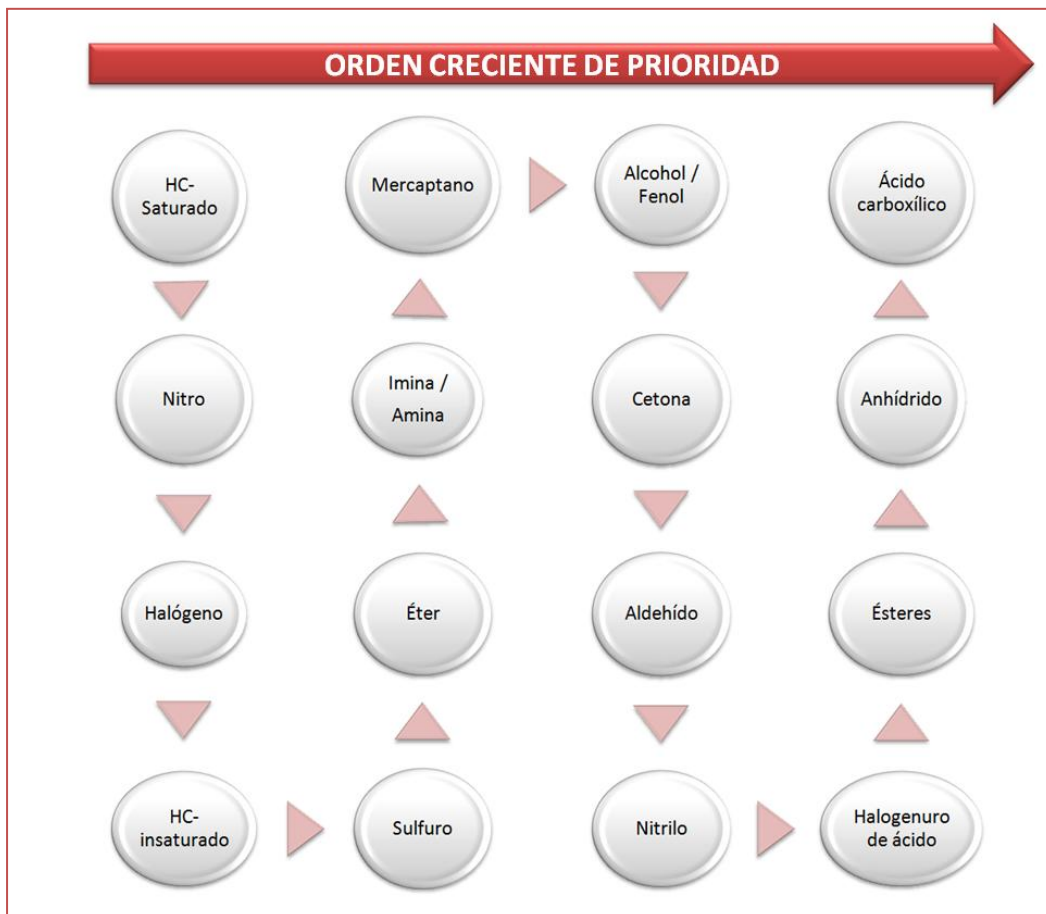


Figura 27. Prioridad de grupos funcionales

4.1. Análisis mediante SPME-GCMS

4.1.1. Optimización del método SPME-GCMS

El método de GCMS utilizado fue optimizado por el CAI-EM para la determinación de VOCs en plásticos y sus correspondientes materias primas; por tanto, sólo se optimizó la parte de HS-SPME para el análisis de pólenes.

La optimización se basó en un diseño experimental factorial aleatorio (para evitar el sesgo) de tres factores, con dos variables de respuesta y una réplica, con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (tabla 15). Para dicha optimización, se realizaron análisis preliminares (screening) con el polen Halapense, la ¹fibra azul clara y a dos temperaturas, 50°C y 90°C. En el ensayo preliminar a 50°C, se identificó el tolueno; dicho compuesto se obtuvo a un tiempo de retención de 30.54 minutos y se perdía al aumentar la temperatura de extracción a 90°C. Por este motivo fue seleccionado como variable de respuesta, junto con el número de picos identificados. Para contabilizar el número de picos seleccionados, se realizó una integración automática, de esta forma se integra con los mismos parámetros y criterios, contabilizando homogéneamente el número de compuestos en todos los ensayos del experimento.

En la tabla 16 se describe el diseño factorial, los experimentos realizados y sus correspondientes resultados.

Tabla 15. Diseño experimental factorial para la optimización de parámetros de SPME

Factores	Niveles	Variables de respuesta
Temperatura de extracción, °C	90	Número de picos detectados
	70	
	50	
	30	
Tiempo de extracción, min.	60	Área del tolueno (t _R = 30,54 minutos)
	90	
Agitación durante la extracción, rpm	0	
	250	

¹ Por normal general, esta fibra es la que más VOCs retiene.

Tabla 16. Diseño experimental factorial y resultados obtenidos

Diseño experimental				Resultados de los experimentos	
BLOQUE	Temperatura de extracción, °C	Tiempo de extracción, minutos	Agitación, rpm	Número de picos detectados	Área del tolueno, u.a.
1	90	30	0	11	N.D.
1	50	90	250	8	97.542
1	50	90	0	7	8.365
1	50	30	0	5	652N.D.
1	90	90	250	10	N.D.
1	70	60	0	20	15.236.589
1	50	30	250	5	6.523
1	90	90	0	9	N.D.
1	90	30	250	15	N.D.
1	70	60	250	26	23.946.158
2	90	30	0	10	N.D.
2	50	90	250	8	38.562
2	50	90	0	6	15.326
2	50	30	0	4	1.215
2	90	90	250	10	N.D.
2	70	60	0	20	19.523.658
2	50	30	250	5	5.632
2	90	90	0	9	N.D.
2	90	30	250	15	N.D.
2	70	60	250	26	24.025.654

A continuación, se detallan los resultados del diseño obtenido mediante el programa informático Statgraphics, dividido en las variables de respuesta seleccionadas.

4.1.1.1. Optimización del número de picos detectados

En la tabla 17 y en las figuras 28-31 se detallan los resultados obtenidos en la optimización del número de picos detectados en función de la temperatura de extracción, tiempo de extracción y agitación. Como puede observarse en los gráficos de Pareto y de efectos principales (figuras 28 y 29), la temperatura y la agitación producen un efecto positivo sobre la variable de respuesta de “número de picos detectados”, siendo más importante el efecto de la temperatura. Sin embargo, el factor tiempo produce un efecto ligeramente negativo.

Con los resultados de interacción entre factores (figura 30) se observa una interacción de tipo inversa entre los factores de temperatura y tiempo sobre la variable de respuesta estudiada. También se observa una interacción positiva entre los factores de temperatura y agitación y una interacción ligeramente negativa entre los factores de tiempo y agitación.

En el gráfico de superficie de respuesta (figura 31) se observa un máximo en las condiciones que se especifican en la tabla 17 considerado como “óptimo”. También se visualizan las condiciones de menor respuesta.

Tabla 17. Resultados de condiciones óptimas para el número de picos detectados

Factor	Inferior	Superior	Óptimo
Temperatura de extracción, °C	50	90	90
Tiempo de extracción, min	30	90	30
Agitación, rpm	0	250	250

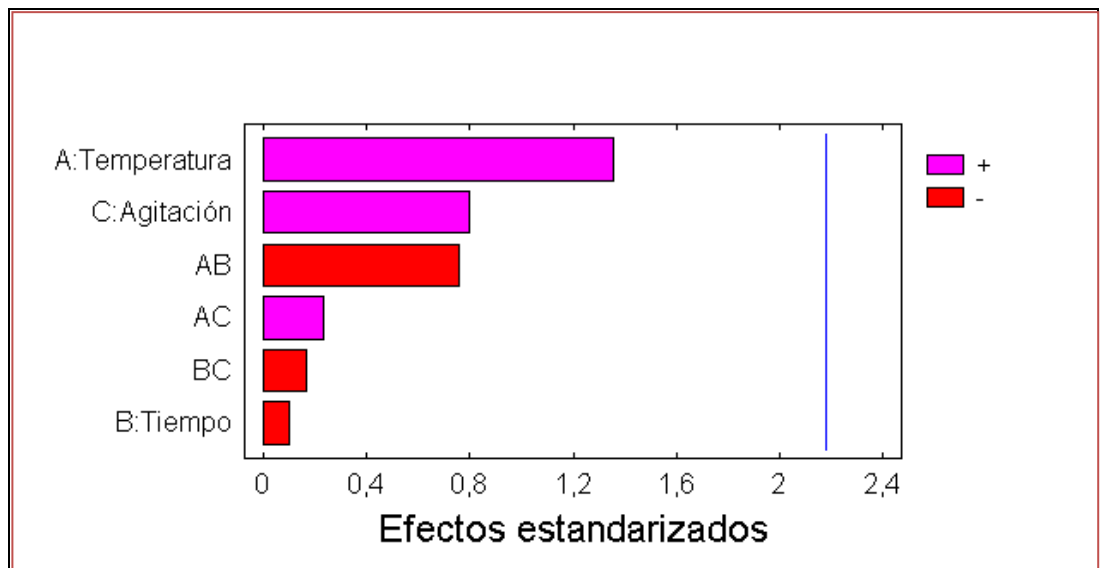


Figura 28. Gráfico de Pareto estandarizado para variable de respuesta "Número de picos detectados"

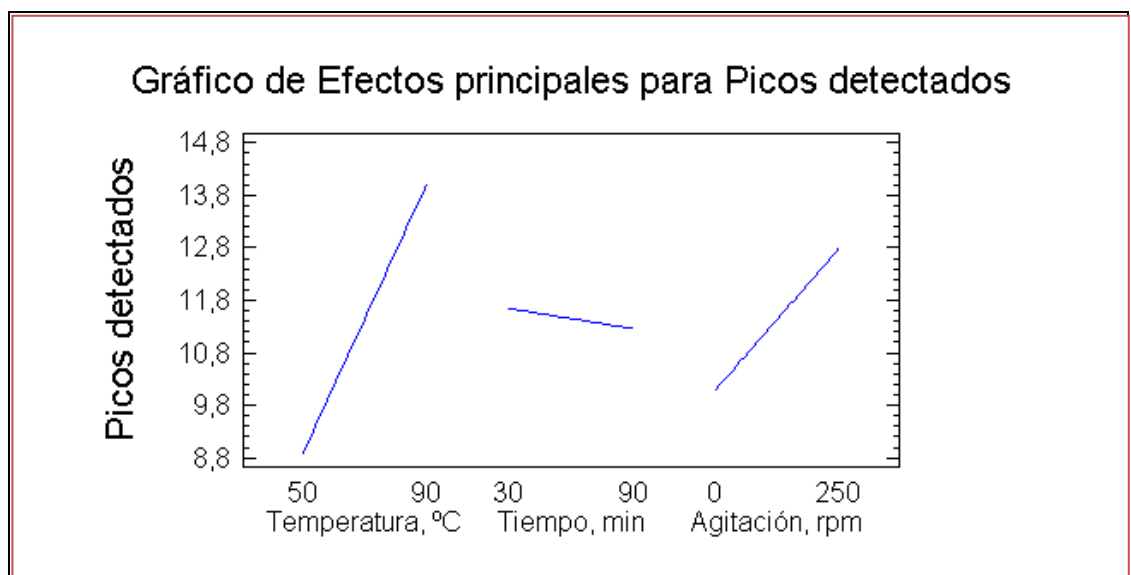


Figura 29. Efectos principales para variable de respuesta "Número de picos detectados"

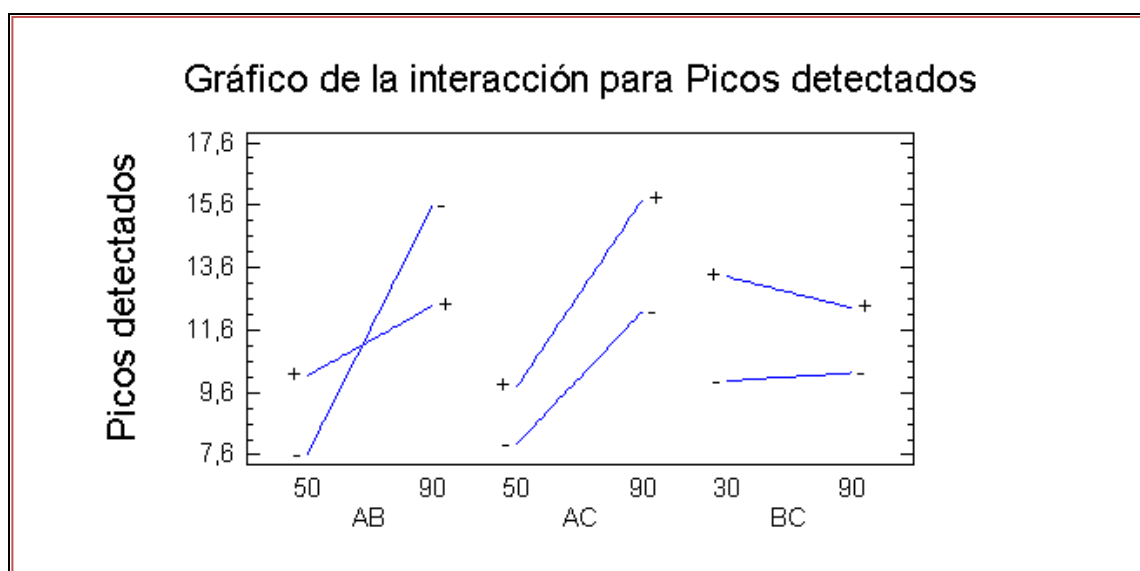


Figura 30. Interacción entre factores en el número de picos detectados

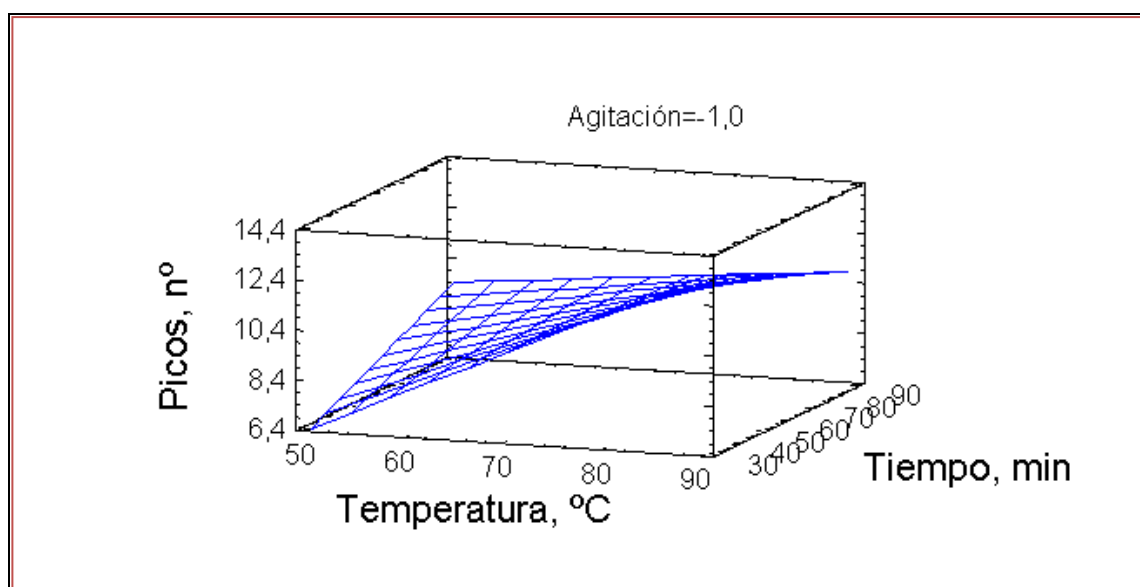


Figura 31. Gráfico de superficie de respuesta para la variable "Número de picos detectados"

4.1.1.2. Optimización del área del tolueno

En la tabla 18 y en las figuras 32-35 se detallan los resultados obtenidos en la optimización del área del tolueno en función de la temperatura de extracción, tiempo de extracción y agitación. Como puede observarse en los

gráficos de Pareto y de efectos principales (figuras 32 y 33), sólo tiene efecto claramente positivo sobre el área de tolueno el factor de agitación. Mientras que el factor de temperatura parece mostrar un efecto ligeramente negativo y el factor tiempo un efecto ligeramente positivo.

Con los resultados de interacción entre factores (figura 34) se observa una interacción negativa entre los factores de agitación y tiempo sobre el área de tolueno. Se observa una interacción prácticamente nula entre los factores de temperatura y agitación y tiempo y agitación, respectivamente.

El gráfico de superficie de respuesta (figura 35) muestra un máximo en las condiciones que se especifican en la tabla 18 considerado como “óptimo”. También se visualizan las condiciones de menor respuesta.

Tabla 18. Resultados de condiciones óptimas para el área del tolueno

Factor	Inferior	Superior	Óptimo
Temperatura de extracción, °C	50	90	50
Tiempo de extracción, min	30	90	90
Agitación, rpm	0	250	250

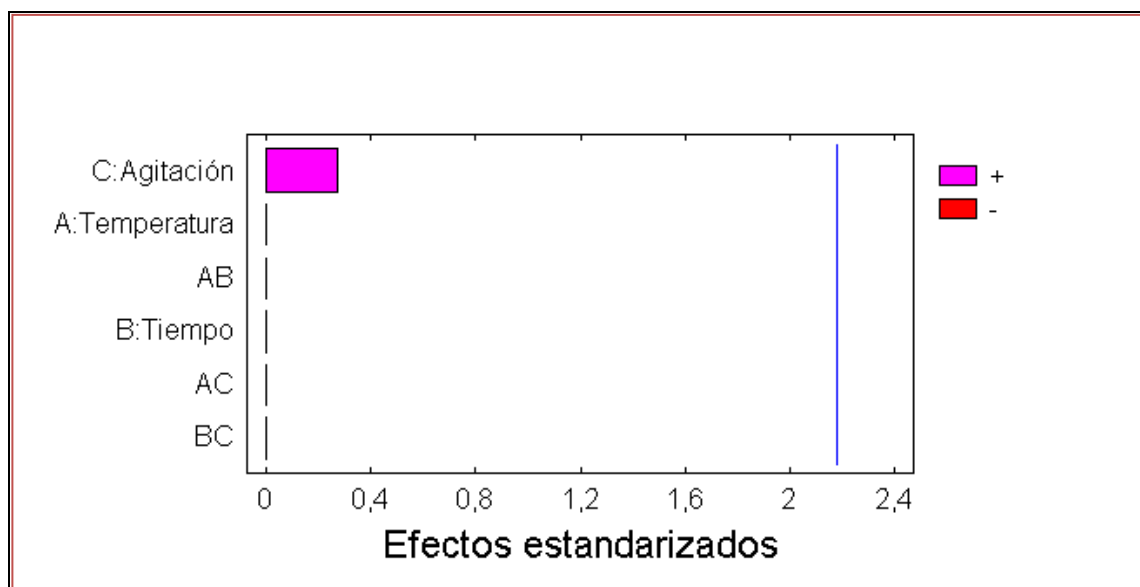


Figura 32. Gráfico de Pareto estandarizado para variable de respuesta "Área del tolueno"

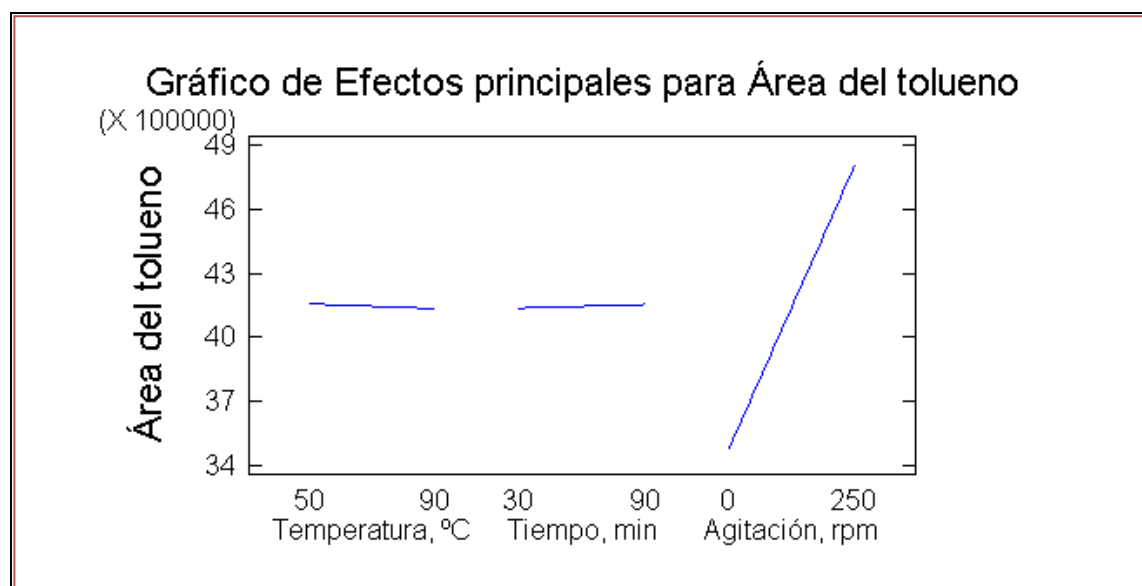


Figura 33. Efectos principales para variable de respuesta "Área del tolueno".

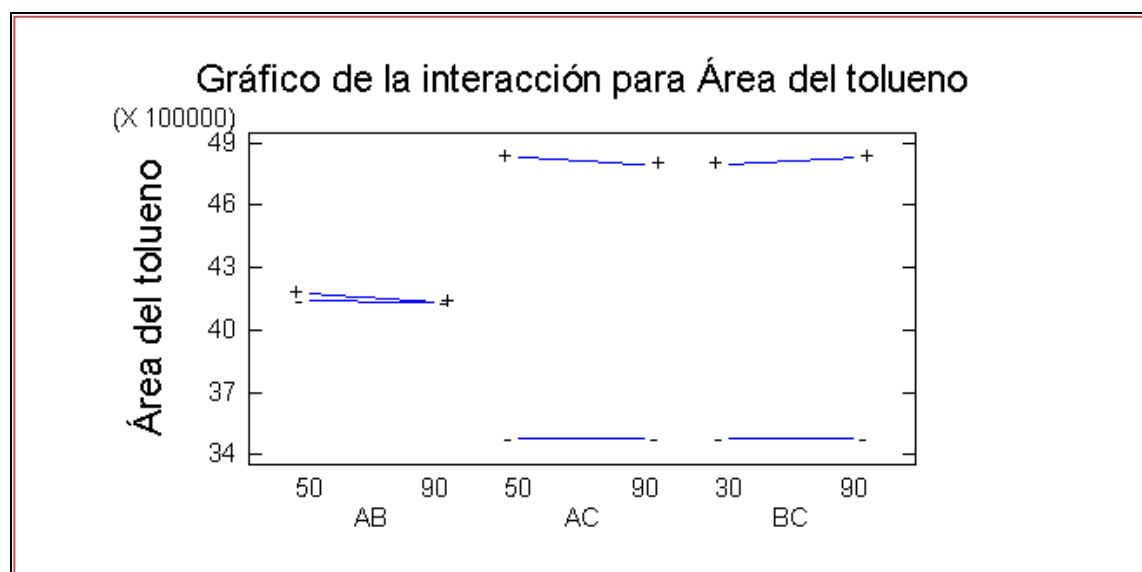


Figura 34. Interacción entre factores en el área del tolueno.

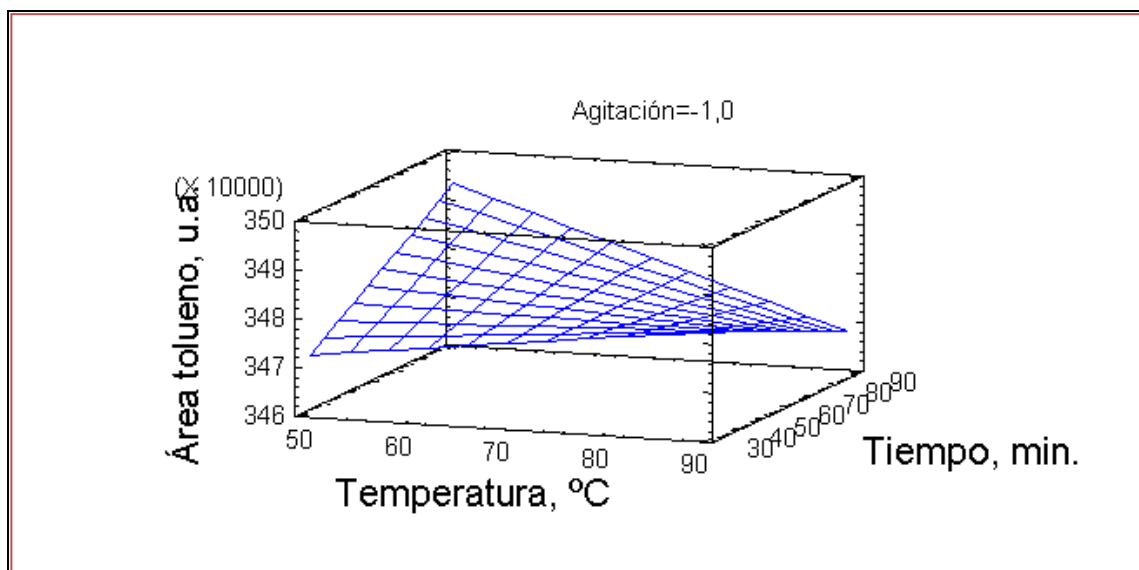


Figura 35. Gráfico de superficie estimada para variable de respuesta "Número de picos detectados"

4.1.1.3. Optimización de condiciones de SPME

Teniendo en cuenta los factores seleccionados y de acuerdo los resultados obtenidos expuestos en los apartados anteriores se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Agitación:** En términos generales, la agitación a 250 rpm es favorable para ambas variables de respuesta, es decir, cuando la extracción se realiza con agitación a 250 rpm, se detecta un mayor número de compuestos y mayor área del pico del tolueno. Por otra parte, cabe destacar que, a la vista de los resultados de las réplicas obtenidas en tabla 17, la agitación proporciona mayor homogeneidad en los resultados de áreas y número de compuestos detectados, siendo las réplicas más reproducibles en presencia de agitación.
- Temperatura de extracción:** El incremento de temperatura es favorable para aumentar el número de compuestos detectados pero no para el área del pico del tolueno, produciendo el efecto ligeramente negativo sobre esta variable de respuesta.
- Tiempo de extracción:** El aumento del tiempo de extracción es favorable para el área del pico del tolueno, siendo ligeramente

positivo, pero no para el número de compuestos detectados, produciendo un efecto contrario en esta variable de respuesta.

En consecuencia, las condiciones óptimas seleccionadas para HS-SPME son las detalladas en la tabla 19. Como puede deducirse, se ha seleccionado agitación a 250 rpm y condiciones intermedias de temperatura de extracción y tiempo, como compromiso en las variables de respuesta.

Tabla 19. Condiciones óptimas para SPME

Factor	Óptimo
Temperatura de extracción, °C	70
Tiempo de extracción, min	60
Agitación, rpm	250

4.1.2. Determinación de VOCs

Se realiza la identificación y semicuantificación de los VOCs existentes en el polen, describiendo la procedencia de algunos compuestos considerados como relevantes por su relación con el objetivo de este trabajo. Algunos de estos compuestos se encuentran en varios pólenes por lo que los comentarios sobre los mismos se realizan en el contexto del primer polen en el que se detectan.

4.1.2.1. Resultados de semicuantificación

Ocho réplicas del polen Halapense se han enriquecido con 1 µL de mezcla MIX-VOCs descrita en el apartado 3.1.4.3.1 y se han analizado mediante HS-SPME-GCMS con las 8 fibras de SPME descritas en la tabla 9, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.

En la tabla 20 se presentan los resultados y las medias de las áreas correspondientes, tras restarles el blanco. Como puede observarse, algunos de los compuestos orgánicos seleccionados no son detectados con ciertas fibras. Por esta razón, la cuantificación de los VOCs en las muestras se realiza con las medias de las áreas. En la figura 36 se muestran algunos cromatogramas de las muestras analizadas para la semicuantificación a modo de ejemplo.

Tabla 20. Resultados muestras enriquecidas

Fibras	** Áreas, u.a.			* MEDIA ÁREAS
	Tolueno	Benzilalcohol	Octadecano	Area media
1-Roja	3.147.005	75.093	15.712.033	6.311.377
2-Verde	390.841	N.D.	4.822.915	2.431.378
3-Blanca	3.693.312	2.196.245	9.366.875	5.085.477
4-Gris	31.689.200	830.866	45.342.921	25.954.329
5-Rosa	11.369.162	2.822.424	38.345.440	17.512.342
6-PEG	5.874.098	2.843.485	3.554.606	4.090.730
7-Verde-Amarilla	N.D.	14.708.913	38.380.565	26.544.739
8-Azul Claro	21.858.668	6.321.522	143.517	9.441.236

* Concentración media 70 ppm

** Restando el área obtenida en el análisis sin enriquecer.

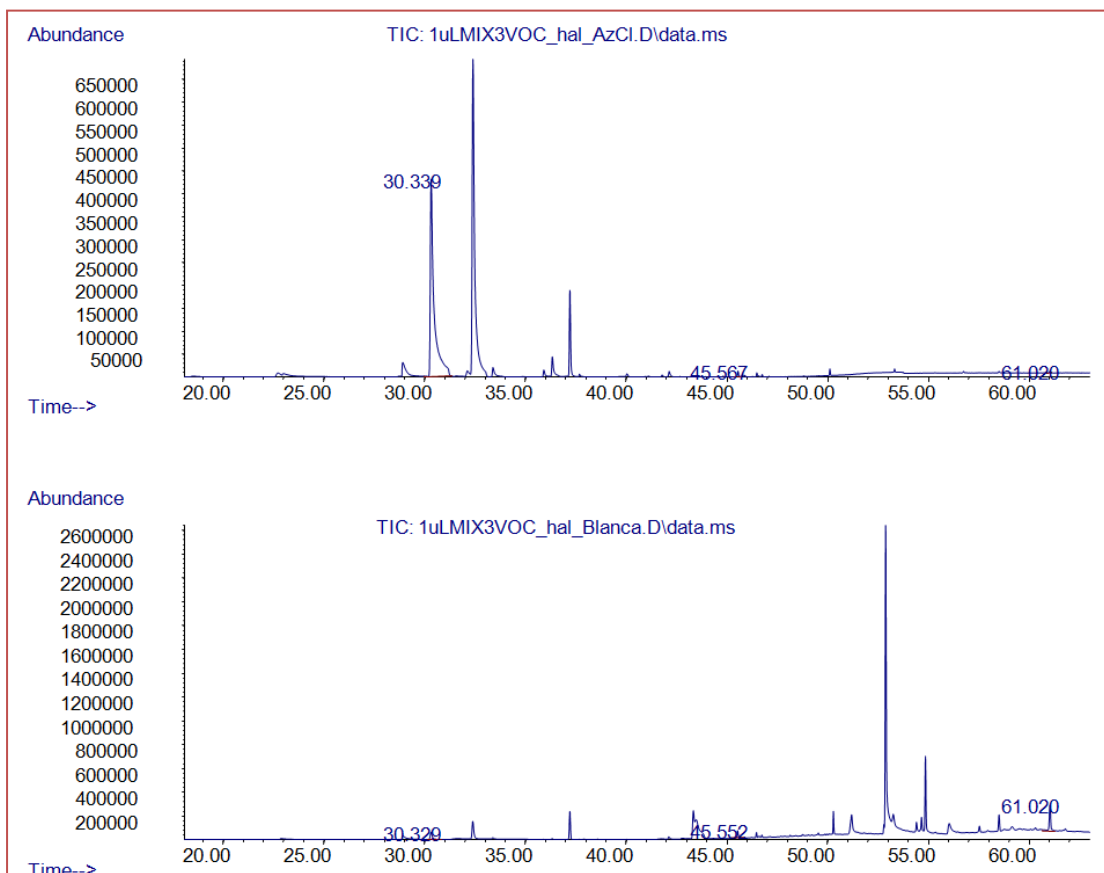


Figura 36. Cromatograma TIC del polen Halapense con 1 μ L de la mezcla MIX-VOCS analizada con dos fibras: a) fibra azul clara; b) fibra blanca.

4.1.2.2. Polen

Las muestras de polen fueron preparadas según se describe en el apartado 3.1 y analizadas mediante HS-SPME-GCMS con las condiciones detalladas en el apartado 3.1.4.2. En el Anexo I se presentan las tablas con los resultados obtenidos en la identificación y semicuantificación de VOCs contenidos en todos los pólenes analizados. En el Anexo II se presentan algunos cromatogramas y espectros, a modo de ejemplo.

4.1.2.2.1. Birch

En total se han identificado 87 VOCs en este polen. A partir de los resultados presentados en la tabla 30 (Anexo I) se elabora la gráfica 37, representando el número de compuestos, clasificados según su grupo funcional, frente a las fibras por las que éstos han sido retenidos. A partir de dichas tabla y gráfica, se realiza una clasificación de las fibras en función del número de VOCs detectados, relacionándolo con el tipo de compuesto:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 45 detectados, seguida de la fibra rosa con 31. Los compuestos retenidos por la fibra azul clara son muy variados, ya que retiene uno o más de un compuesto de cada tipo, abarcando la mayoría de los grupos funcionales principales, excepto aminas, que sólo se han detectado en el análisis con la fibra violeta clara, y los éteres, retenidos por las fibras rosa y gris. De la fibra azul clara cabe destacar la gran afinidad que presenta por los ésteres y derivados de benceno contenidos en este polen, siendo éstos los compuestos mayoritariamente retenidos. Respecto a la fibra rosa, los compuestos cuyos grupos funcionales mayoritariamente retenidos son derivados de benceno, ésteres e hidrocarburos insaturados.
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras blanca, violeta clara y gris retienen 30, 30 y 25 compuestos, respectivamente. Los compuestos con grupos funcionales mayoritariamente retenidos por la fibra gris son derivados de benceno. En el caso de la fibra blanca son ésteres y alcoholes, aunque cabe destacar su afinidad por los compuestos organosulfurados contenidos en este polen. La fibra violeta clara retiene principalmente alcoholes y compuestos orgánicos que contienen azufre.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras verde-amarilla, roja y verde retienen 19, 13 y 4 compuestos, respectivamente. Los compuestos con grupos funcionales mayoritariamente retenidos en la fibra verde-amarilla son ésteres e hidrocarburos saturados. En el caso de la fibra roja no hay un grupo mayoritario predominante, reteniendo por igual a derivados de benceno, ésteres e hidrocarburos saturados. Por último, la fibra verde retiene sólo los compuestos del tipo

organosulfurados e hidrocarburos. De los 3 hidrocarburos saturados, uno de ellos, el 10-metilnonadecano y sólo se detecta con esta fibra; por tanto, no se puede descartar esta fibra para un estudio completo de screening. Algo similar sucede con las demás fibras, siendo todas imprescindibles para una completa identificación de volátiles.

En el apartado 4.1.3 se discute de una forma global el comportamiento de las fibras relacionándola con el tipo de fase estacionaria.

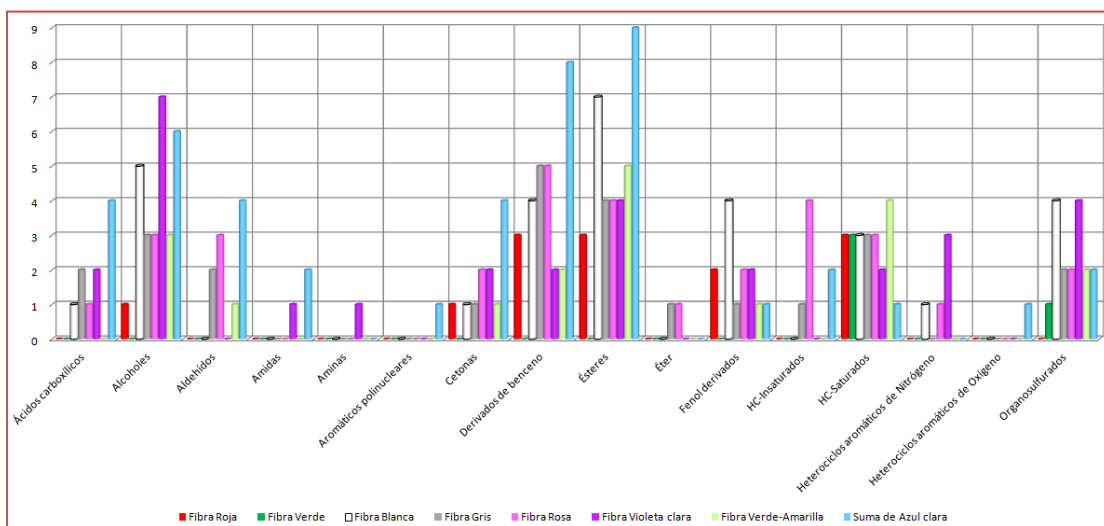


Figura 37. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (BIRCH)

En el gráfico 38 se presenta el tipo de compuestos orgánicos identificados en este polen. Como puede observarse, los compuestos mayoritarios son los alcoholes y ésteres con un contenido del 21% y 16%, respectivamente. Aunque la mayoría de los compuestos son de origen natural, típicos en aromas de flores, se han detectado algunos compuestos procedentes de actividad antropogénica. De hecho, dentro del grupo de ésteres se han detectado derivados del ftalato, que son compuestos relacionados con la industria y materiales plásticos, en este caso podría proceder del recipiente. En los hidrocarburos totales, con un 22%, se diferencian los insaturados (HC-Insaturados), con un 5%, los saturados (HC-Saturados), con un 8%, y benceno y derivados del benceno, con un 9%. Se detecta también un 1% de aromáticos polinucleares, que corresponde al compuesto 2-metil-naftaleno. Este tipo de

compuestos será relacionado con los gases de combustión procedentes de los vehículos en el apartado 4.3. El 7% son compuestos de azufre, entre los que se encuentra el dimetilsulfóxido. Este compuesto es un subproducto del procesamiento de la madera en la fabricación de pulpa de celulosa, que es la materia prima para la producción de, entre otros, el papel y se usa frecuentemente como disolvente orgánico. En ingeniería se utiliza para ensayar la durabilidad de algunos materiales¹¹¹. A pesar de sus numerosas aplicaciones industriales, también está presente de forma natural y es el responsable del característicos olor y sabor de muchos olores y sabores ¹¹¹. Este compuesto, junto con dimetil sulfona, se detecta en casi la totalidad de los pólenes, como se verá en apartados posteriores.

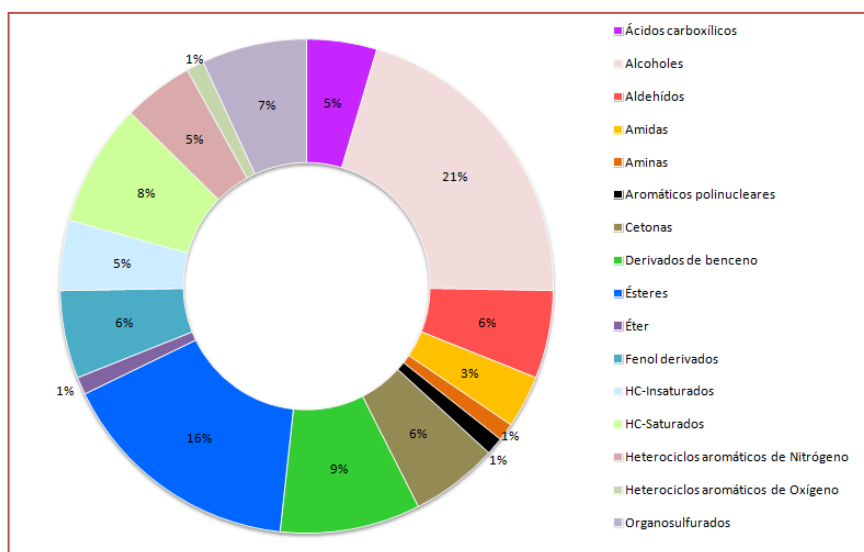


Figura 38. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (BIRCH)

Con el objetivo de clasificar el comportamiento de las fibras utilizadas frente al tipo de VOCs retenido según su grupo funcional, teniendo en cuenta la competitividad en retención existente entre los VOCs contenidos en el polen por la fibra, se realizó un estudio mediante análisis de componentes principales (PCA). Para ello, se elaboró una tabla de datos teniendo en cuenta el grupo funcional del compuesto retenido por cada fibra clasificado en la tabla 30 y asignando el valor 0 cuando no ha sido detectado y el valor 1 cuando el

compuesto ha sido detectado. El procedimiento seguido para elaborar la tabla se representa usando el ejemplo de la tabla 21.

Tabla 21. Ejemplo de una tabla de datos para análisis PCA

Grupo funcional	Compuestos	tr, min	Código de color de fibras SPME							
			Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde amarilla	Azul clara
Ácido Carboxílico	Acetic acid	22,9	0	0	0	1	0	1	0	1
Cetona	2-Propanone, 1-hydroxy-	26,4	0	0	0	0	0	0	0	1
Derivados de benceno	Toluene	30,4	1	0	1	1	1	0	0	1

En la figura 39 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA. Se diferencian 3 grupos en función del tipo de VOCs según su grupo funcional principal, por lo que las fibras dentro de cada grupo tienen comportamientos de retención parecidos. Esto responde claramente al efecto de competitividad de los VOCs contenidos en el polen por la fibra, ya que estos grupos varían en cada polen.

- Grupo I: Fibra azul clara.
- Grupo II: Fibras rosa, roja, gris y blanca. Como puede observarse, la fibra blanca está justo en el límite entre los grupos II y III.
- Grupo III: Fibras verde amarilla, violeta clara y verde. Cabe destacar que la fibra verde está diferenciada de las otras dos, dentro de su grupo. Esto es debido a que, a pesar de tener comportamientos parecidos en cuanto al tipo de VOCs retenidos en este polen, la fibra verde es de naturaleza diferente a las otras dos de su grupo.

En la figura 39 puede observarse el comportamiento comparativo de las fibras. Los vectores representados en forma de rectas en dicha figura teniendo en cuenta el tipo de VOCs retenidos, indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento opuesto al de las fibras verde y/o violeta clara. Aunque bien es cierto que la fibra azul clara retiene compuestos de diversa polaridad, éste no es el único factor a tener en cuenta para estudiar el tipo de VOCs retenidos.

Cabe destacar que esta fibra es la única que retiene compuestos polares de bajo peso molecular, tales como el ácido acético o el ácido propanóico, respondiendo posiblemente a un factor adicional de tamaño.

Por último, teniendo en cuenta que los puntos de dicha figura representan los compuestos volátiles más representativos del conjunto total de compuestos detectados, se observa que la distribución de los mismos está repartida entre todas las fibras, sin apreciarse ningún tipo de agrupación preferente en torno a un grupo de fibras concreto.

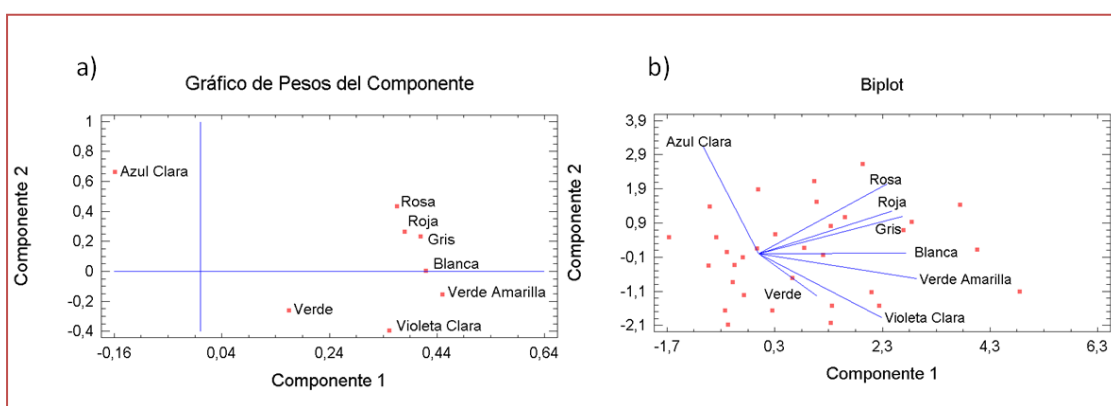


Figura 39. Resultados de estudio estadístico PCA (BIRCH)

4.1.2.2.2. Grass

Con el objetivo de analizar los resultados obtenidos se realizarán los mismos estudios estadísticos utilizando la estrategia explicada en el polen Birch (apartado 4.1.2.2.1).

En total se han identificado 114 VOCs en esta muestra. A partir de los resultados presentados en la tabla 31 (Anexo I) se elabora la gráfica 40, representando el número de compuestos, frente a las fibras por los que éstos han sido retenidos. A continuación, se clasifican las fibras en función del número de VOCs detectados, relacionándolo con el tipo de compuesto:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra gris es la que más compuestos retiene con 51 detectados, presentando una gran afinidad por los

aldehídos ya que es el tipo de compuesto más retenido. La segunda fibra con mayor capacidad de retención es la fibra azul clara, con 47 VOCs detectados, siendo los compuestos carbonílicos y los ésteres los compuestos más abundantes. Además, los compuestos del tipo heterociclos aromáticos de oxígenos sólo se retienen por la fibra azul clara.

- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras rosa, verde-amarilla, violeta clara y blanca retienen 34, 29, 27 y 26, respectivamente. La fibra rosa retiene mayoritariamente aldehídos y derivados de benceno; las fibras verde-amarilla y blanca retienen principalmente ésteres y la violeta clara los alcoholes. Existen compuestos que sólo son retenidos por una única fibra, como por ejemplo las hidracinas, detectadas sólo con la fibra blanca y las aminas, detectadas sólo por la fibra violeta clara.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras roja y verde son las que menos compuestos se ha retenido, con 8 y 1 VOCs, respectivamente. A pesar de que la fibra verde sólo retiene un compuesto, el 2,4-bis-dimetuletil-fenol, éste sólo es detectado en esta fibra y por tanto es imprescindible para un estudio cualitativo completo. Este hecho sucede con todas las fibras, no pudiendo descartar ninguna.

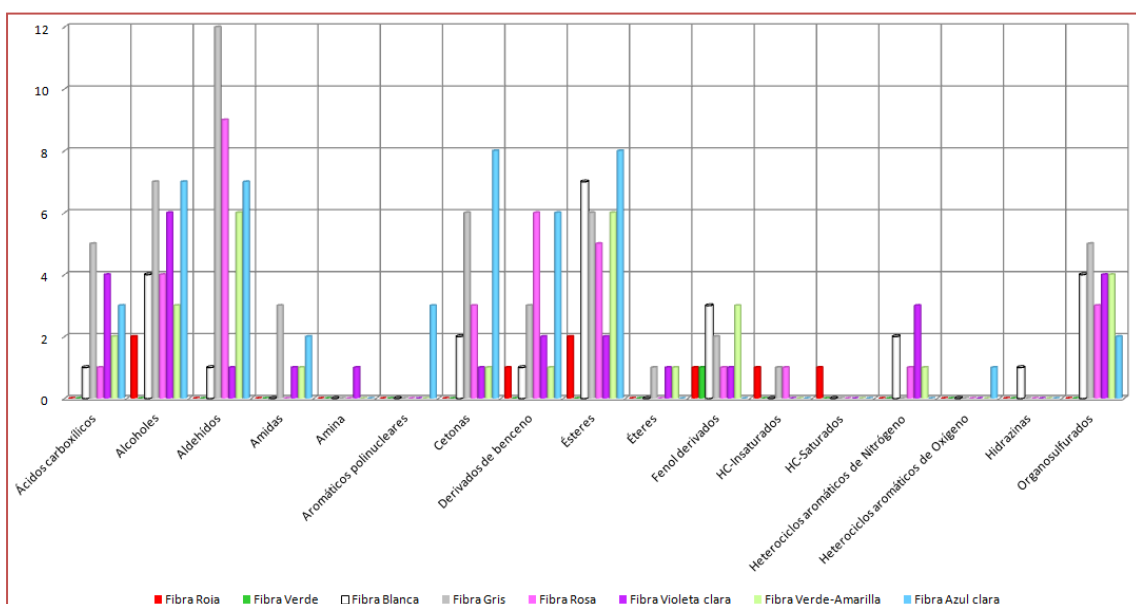


Figura 40. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (GRASS)

En el gráfico 41 se representa el tipo de compuestos orgánicos identificados. Como puede observarse, este polen contiene mayoritariamente aldehídos, ésteres y alcoholes. Cabe destacar la presencia de organosulfurados, la mayoría de los cuales son derivados del tiofeno y sulfóxidos, por ejemplo el dimetil sulfóxido. Aunque la mayoría pueden considerarse como típicos en plantas y aromas vegetales, se detectan ciertos compuestos de procedencia antropogénica evidente, como por ejemplo algunos BTEX, tolueno o p-xileno, o naftaleno. Este punto será ampliamente discutido en el apartado 4.3. Cabe destacar la presencia de hidracinas, en concreto la 1,1-dimetil,2-propil-hidracina. Las hidracinas y derivados suelen emplearse como espumantes para la preparación de espumas poliméricas y como precursor de catalizadores en polímeros y en algunos fármacos; sin embargo, debido a su elevada toxicidad se está intentando sustituir por otros compuestos, pero también son generadas por algunos microorganismos¹¹².

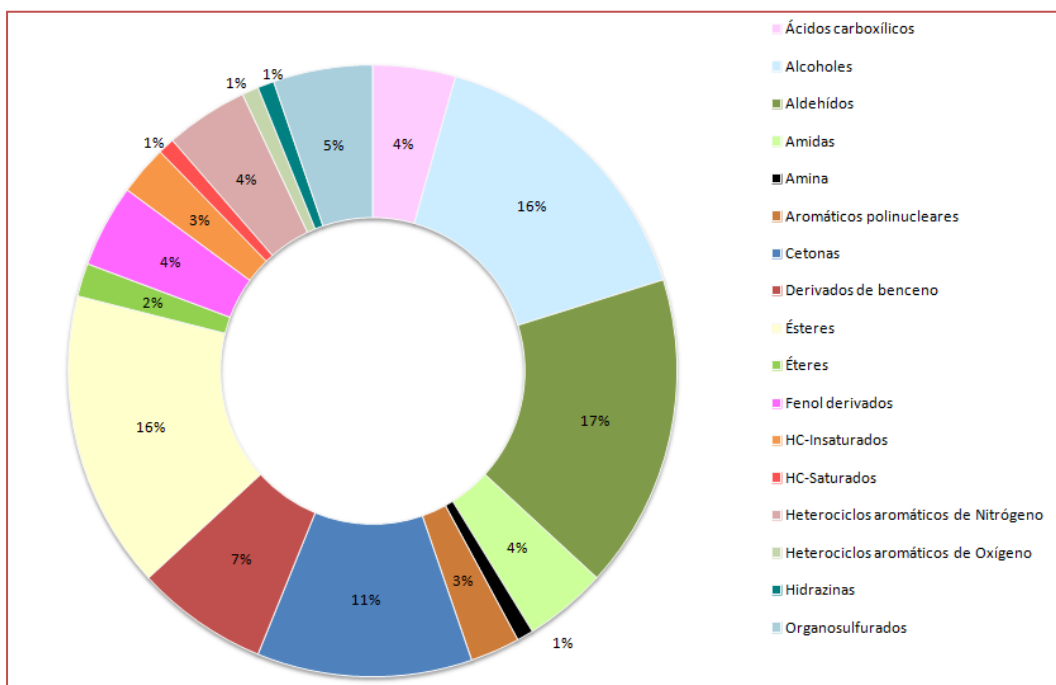


Figura 41. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (GRASS)

Para realizar el estudio estadístico mediante PCA, se elaboró una tabla de datos similar a la presentada en el apartado anterior. En la figura 42, se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, se diferencian 4 grupos en función del tipo de VOCs detectados según su grupo funcional principal, indicando comportamientos de retención parecidos en las fibras que están dentro de un grupo.

- Grupo I: Fibra Verde.
- Grupo II: Fibra Azul clara y Roja.
- Grupo III: Fibras Rosa, Blanca y Verde-Amarilla. Dentro de este grupo, las fibras aparecen separadas entre sí. La fibra verde-amarilla está muy próxima al límite del otro grupo, encontrándose más cerca de la fibra violeta clara (grupo IV) que a las de su propio grupo.
- Grupo IV: Fibras Violeta clara y Gris.

En la figura 42 se presenta el comportamiento comparativo de las fibras. Como puede observarse la fibra verde tiene un comportamiento opuesto al de las fibras blanca y/o rosa. Sin embargo, las fibras verde-amarilla, gris y violeta clara tienen comportamientos parecidos.

Teniendo en cuenta que los puntos de la figura 42b representan los compuestos volátiles más representativos del conjunto total de compuestos detectados, se observa que la distribución de los mismos está repartida entre todas las fibras, sin apreciarse ningún agrupamiento preferente del mismo en torno a un grupo de fibras concreto.

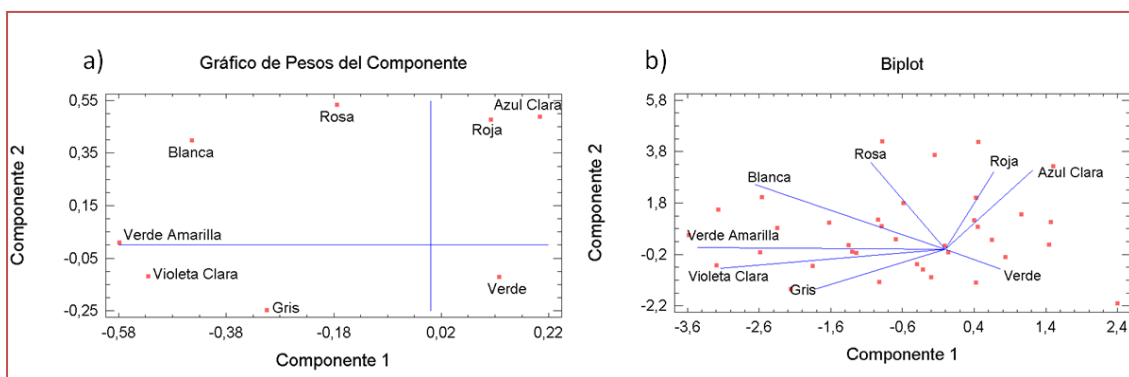


Figura 42. Resultados de estudio estadístico PCA (GRASS)

4.1.2.2.3. Halapense

En total, se han identificado 61 VOCs (tabla 32 en Anexo I). A partir de ellos se elabora la gráfica 43, donde se representan el número de compuestos frente a las fibras por los que han sido retenidos. Se obtienen las siguientes observaciones, atendiendo al tipo de fibra y el número y tipo de VOCs retenido:

- **Con capacidad de retención alta:** de los 29 VOCs detectados por la fibra azul clara los compuestos mayoritarios son los derivados del benceno. Aunque bien es cierto que esta fibra retiene compuestos muy variados, abarcando la mayoría de los grupos funcionales principales, es decir, retiene uno o más de un compuesto de cada tipo de compuestos divididos por grupos funcionales. No obstante, llama la atención que en este polen dicha fibra no retiene ni aldehídos y ni éteres; de hecho, es el único polen donde la fibra azul claro no retiene ningún aldehído, algunos de los cuales si han sido retenidos en otros pólenes. Esto podría explicarse por el efecto de competitividad por elevada concentración del compuesto tetracloroetileno, que podría desplazar a ciertos compuestos que, en otros pólenes sin este efecto, sí que son retenidos por la fibra azul clara. Otra característica a resaltar es que esta fibra presenta afinidad exclusiva por los compuestos aromáticos polinucleares e hidrocarburos saturados.
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras blanca, rosa, violeta clara y gris retienen 19, 17, 17 y 16, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos por la fibra gris son derivados de benceno y presenta afinidad exclusiva por los éteres. En el caso de la fibra rosa, los grupos funcionales retenidos son compuestos carbonílicos, en concreto los compuestos cetónicos y presenta afinidad exclusiva por los aldehídos. Las fibras violeta clara y blanca retienen principalmente ésteres. Cabe destacar la afinidad que presenta la fibra violeta clara por los compuestos organosulfurados y por los compuestos heterocíclicos aromáticos de nitrógeno.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras verde-amarilla, roja y verde retienen 12, 4 y 1 compuestos, respectivamente. En el caso de las fibras verde-amarilla y roja no hay un grupo funcional claramente retenido por las mismas, repartiéndose entre los derivados de

benceno, ésteres, éteres y derivados del fenol y ésteres, respectivamente. Sin embargo, los compuestos detectados en la fibra roja han sido retenidos por otras fibras, fundamentalmente por la fibra blanca. En consecuencia, la fibra roja podría descartarse para este polen ya que no aporta información cualitativa distinta que la obtenida por las otras fibras. La fibra verde retiene sólo un éster que no ha sido identificado en ninguna otra fibra, el 2-metil-3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil éster. Por tanto, no se puede descartar esta fibra, ya que completa la información cualitativa del polen.

En el apartado 4.1.3 se discute de una forma global el comportamiento de las fibras relacionándose con el tipo de fase estacionaria.

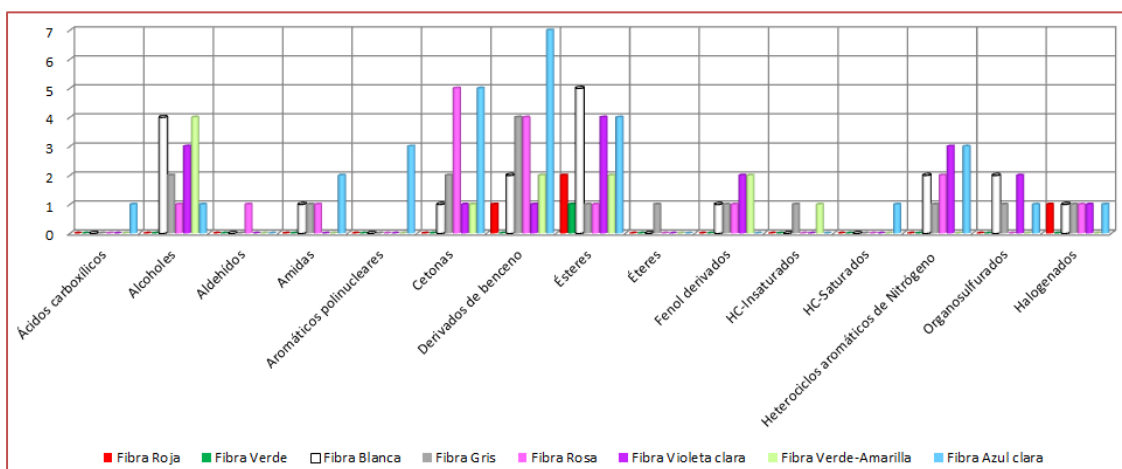


Figura 43. Número de cada tipo de compuestos retenidos por cada fibra (HALAPENSE)

En el gráfico 44 se presenta el tipo de compuestos orgánicos identificados en este polen. Como puede observarse, el tipo de compuestos mayoritarios son ésteres, compuestos cetónicos, derivados de benceno y alcoholes, con contenidos del 18%, 15%, 13% y 13%, respectivamente. Se identifica la presencia de heterociclos aromáticos de nitrógeno con un 11% del contenido total, siendo la mayoría derivados de bezimidazoles. Este tipo de compuestos tiene utilidad farmacológica. En el grupo de compuestos halogenados se ha incluido el tetracloroetileno como excepción, ya que aunque debería considerarse como hidrocarburo saturado según los criterios

establecidos en el apartado 4, se ha clasificado como compuesto halogenado dada la importancia de este tipo de compuestos para el medio ambiente. Cabe destacar la elevada concentración media estimada de este compuesto en 383 ppm, ya que está relacionado con la industria textil, pudiéndose considerar un contaminante marcador de la actividad industrial de la zona geográfica donde se ha colectado el polen **113**.

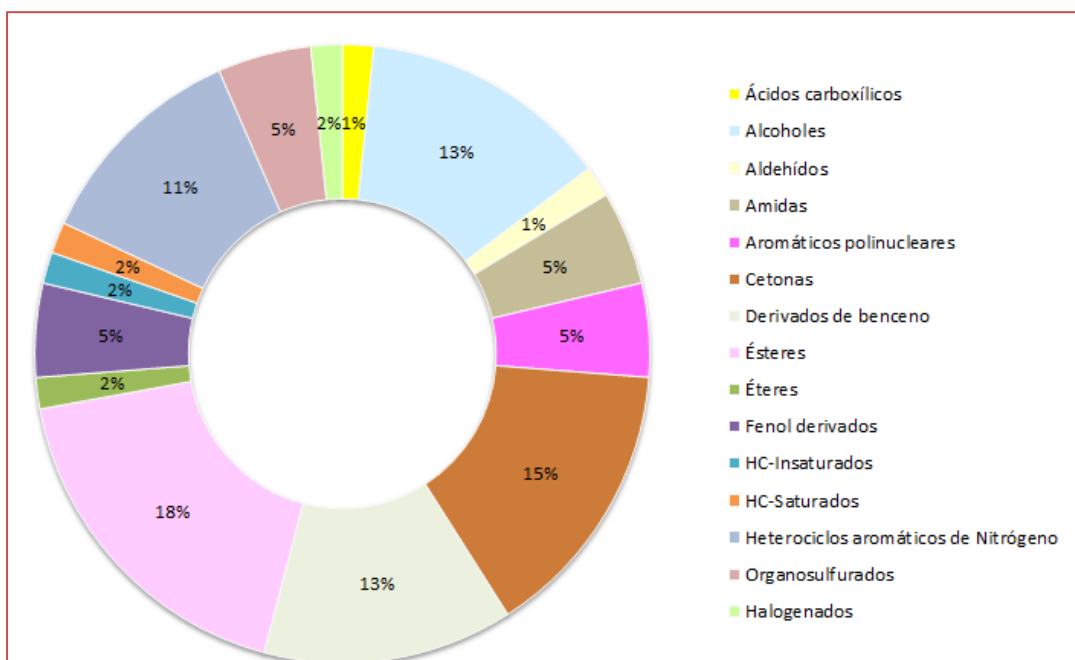


Figura 44. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (HALAPENSE)

En la figura 45 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA donde se diferencian 4 grupos de fibras en función del tipo de compuestos retenidos:

- Grupo I: Fibra verde.
- Grupo II: Fibra azul clara.
- Grupo III: Fibras verde-amarilla y violeta clara.
- Grupo IV: Fibras gris, blanca, roja y rosa. Dentro de este grupo se observa una mayor relación entre las tres primeras, siendo la fibra rosa la más diferente de este grupo.

En la figura 45b se muestra el comportamiento comparativo de las fibras. Los vectores indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento opuesto, teniendo en cuenta el tipo de VOCs retenido, al de las fibras verde-amarilla y/o violeta clara. Lo mismo sucede con la fibra verde y las fibras gris, blanca, roja y rosa. Por otra parte, se podría deducir que las fibras rosa y azul clara no tienen comportamientos tan diferentes entre sí, aunque se encuentren en grupos diferentes.

Atendiendo a cómo están distribuidos los VOCs más representativos en el gráfico (puntos) se observa que no hay una agrupación de los mismos, en torno a ninguna fibra.

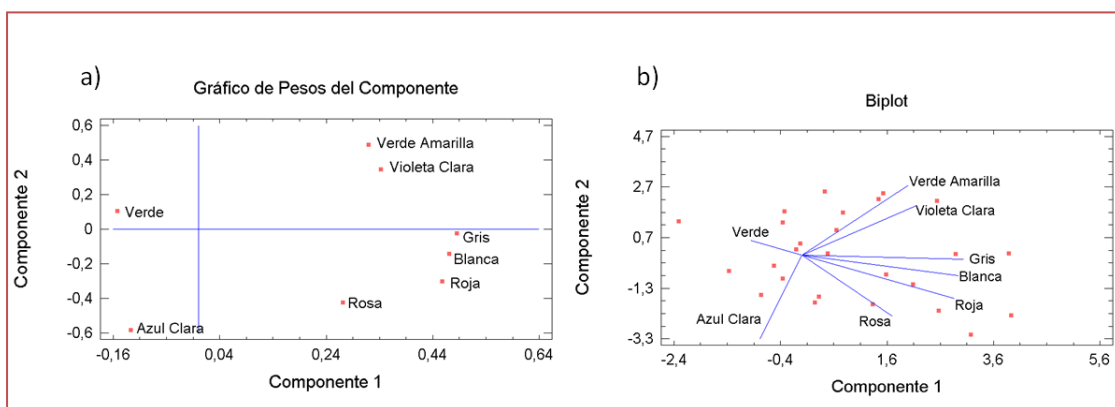


Figura 45. Resultados de estudio estadístico PCA (HALAPENSE)

4.1.2.2.4. Olmo

En total, se han identificado 55 VOCs (tabla 33 en Anexo I). A partir de ellos se elabora la gráfica 46, que representa el número de compuestos frente a las fibras por los que éstos han sido retenidos. En función del número de VOCs detectado, se diferencian tres grupos de fibras:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 28 compuestos detectados, seguida de la fibra rosa con 19. Los compuestos retenidos por la fibra azul clara son mayoritariamente los alcoholes y presenta también gran afinidad por los hidrocarburos saturados. Como puede observarse, esta fibra

retiene una amplia diversidad de compuestos clasificados, excepto el grupo de aminas, detectadas con las fibras verde-amarilla y violeta clara; el grupo de isocianatos, retenidos exclusivamente por la fibra blanca, y compuestos halogenados, únicamente por la fibra rosa. Ésta última fibra retiene mayoritariamente a los derivados del benceno.

- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras blanca, violeta clara gris, y verde-amarilla retienen 12, 12, 11 y 11 respectivamente. Como puede observarse, la fibra azul clara retiene un amplio abanico de compuestos clasificados según su grupo funcional, excepto el grupo de aminas, detectadas con las fibras verde-amarilla y violeta clara; el grupo de isocianatos, retenidos exclusivamente por la fibra blanca, y compuestos halogenados, detectados únicamente por la fibra rosa. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos son ésteres, alcoholes, derivados de benceno e hidrocarburos saturados y ésteres, para las cuatro fibras, respectivamente.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras roja y verde retienen 3 y 2 compuestos, respectivamente. En el caso de la fibra roja no retiene preferentemente ningún, repartiéndose entre aldehídos, derivados de benceno e hidrocarburos saturados. Los tres compuestos que retiene son identificados con la fibra gris, por tanto, se podría descartar ya que no aporta información cualitativa adicional con respecto a las otras fibras. En el caso de la fibra verde, sólo se detectan dos hidrocarburos saturados, el eicosano y hexadecano, el primero de ellos sólo se ha identificado con esta fibra, por lo que no se puede prescindir para este estudio.

A partir de la misma figura puede deducirse la afinidad de cada fibra por ciertos compuestos y relacionarlo con otras fibras, como por ejemplo la afinidad de las fibras blanca, gris, violeta clara y azul clara por los compuestos organosulfurados.

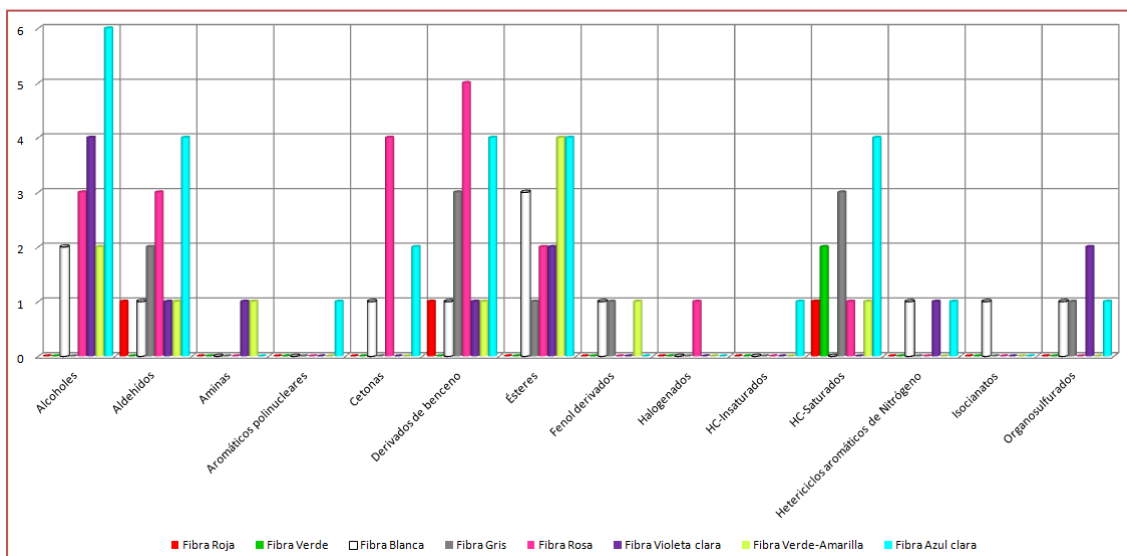


Figura 46. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (OLMO)

En el gráfico 47 se muestra el tipo de compuestos orgánicos identificados. Como puede observarse, los compuestos mayoritarios son los alcoholes y ésteres con un contenido del 18% y 16%, respectivamente. Cabe destacar el elevado contenido en hidrocarburos saturados (HC-saturados), con un 14%, siendo todos ellos hidrocarburos de cadenas lineales comprendidas entre 7 y 20 carbonos. El 2% son clasificados como “halogenados” se debe a la detección de clorometano. Este compuesto tiene una doble procedencia, pudiendo producirse en grandes cantidades de forma natural, en los océanos por la acción de la luz sobre la biomasa y el cloruro en la espuma de mar, y de forma industrial como refrigerante, aunque actualmente se ha sustituido en los países europeos, debido a su gran impacto en la capa de ozono estratosférico **114**. El 2% corresponden a isocianatos **115**.

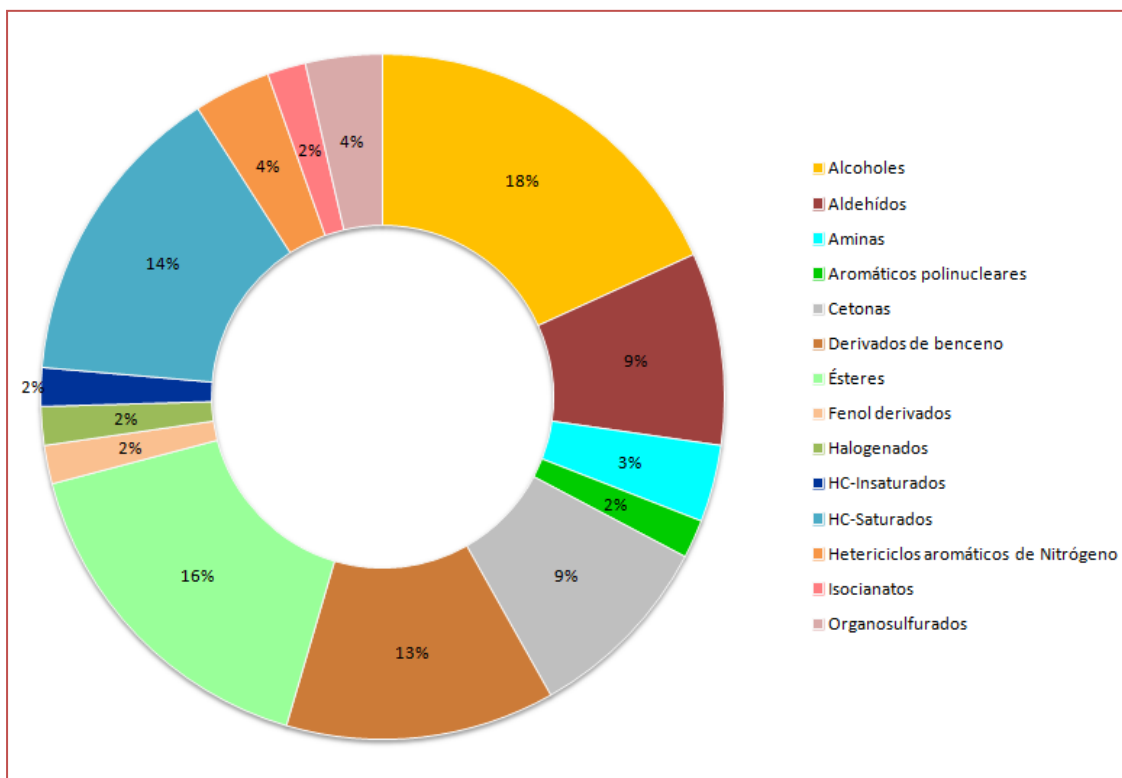


Figura 47. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (OLMO)

En la figura 48 se presentan los resultados obtenidos en el análisis PCA. Se diferencian 4 grupos en función del tipo de VOCs:

- Grupo I: Fibra azul clara.
- Grupo II: Fibra rosa
- Grupo III: Fibras verde-amarilla, violeta clara y blanca.
- Grupo IV: Fibras gris, roja y verde

La similitud de comportamiento entre las fibras de los grupos III y IV también se confirma en el gráfico. Los vectores indican además que la fibra rosa (grupo II) tiene un comportamiento opuesto al de las fibras verde-amarilla, violeta clara y blanca (grupo III). Contrastando esta información con la obtenida en el gráfico 46, se observa que en algunos compuestos tales como halógenos,

aminas, organosulfurados o isocianatos, son retenidos por alguna de las fibras del grupo III y no por la rosa, o viceversa.

Teniendo en cuenta que los puntos de la figura 48 corresponden a los compuestos volátiles más representativos del conjunto total de compuestos detectados, se observa que la distribución de los mismos está repartida entre todas las fibras, si bien se aprecia una ligera agrupación de unos 14 puntos alrededor de las fibras violeta clara, blanca y verde-amarilla.

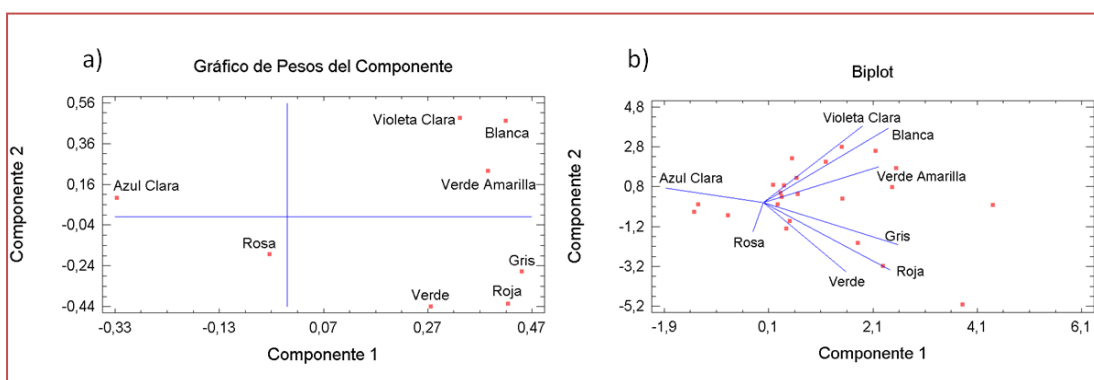


Figura 48. Resultados de estudio estadístico PCA (OLMO)

4.1.2.2.5. Plátano

En total se han identificado 69 VOCs en esta muestra. Con los resultados presentados en la tabla 34 (Anexo I) se elabora la gráfica 49, representando el número de compuestos, clasificados según su grupo funcional, frente a las fibras por los que éstos han sido retenidos, pudiéndose agrupar las fibras según el número de VOCs detectados, comentando aspectos de afinidad en cada caso:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que presenta mayor poder de retención, con 36 detectados, seguida de la fibra rosa con 35. Los compuestos retenidos por la fibra azul clara son mayoritariamente hidrocarburos saturados y alcoholes. Como puede observarse, la fibra azul clara no retienen los VOCs que contienen únicamente nitrógeno en su grupo principal, así, con esta fibra no se detectan aminas, heterociclos aromáticos de nitrógeno e hidracinas. En la fibra rosa, son mayoritariamente retenidos los hidrocarburos

saturados, derivados de benceno y ésteres. Esta fibra muestra mayor afinidad por los derivados de benceno que la fibra azul clara, sin embargo, no sucede lo mismo con estructuras similares, como los compuestos aromáticos policíclicos, que sólo se han detectado con la fibra azul clara

- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras gris, blanca, violeta clara y verde-amarilla retienen 17, 16, 15 y 14, respectivamente. Los grupos funcionales principalmente retenidos por la fibra gris son derivados de benceno, hidrocarburos saturados y aldehídos. En el caso de la fibra blanca, son los ésteres. La fibra violeta clara retiene principalmente alcoholes y ésteres y por último, la fibra verde-amarilla retiene mayoritariamente alcoholes.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras roja y verde retienen 7 y 1 compuestos, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos por la fibra roja son los hidrocarburos saturados. En el caso de la fibra verde retiene únicamente un hidrocarburo saturado de cadena lineal, el hexadecane, que también es retenido por otras fibras. Lo mismo sucede con la fibra roja. Ambas fibras son prescindibles para este estudio.

En el apartado 4.1.3 se presenta de una forma global el comportamiento de las fibras en relación con el tipo de fase estacionaria.

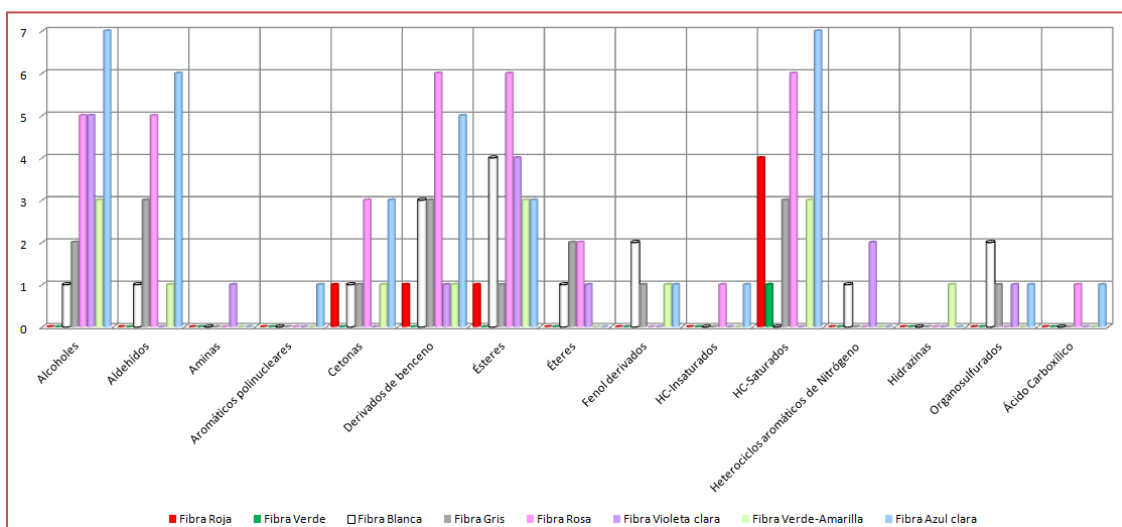


Figura 49. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (PLATANO)

En el gráfico 50 se muestra el tipo de compuestos orgánicos identificados. Los compuestos mayoritarios son alcoholes, ésteres y aldehídos, con contenidos del 17%, 15% y 13%, respectivamente. Aunque la mayoría de estos compuestos son de origen natural, típicos en aromas vegetales, cabe destacar la presencia importante de hidrocarburos saturados (12%), de los cuales el 80% son lineales. En este grupo se han identificados compuestos como eicosane y 10-metilnonadecano, relacionados directamente en apartados posteriores con la emisión de gases de combustión procedentes de vehículos (apartado 4.3)

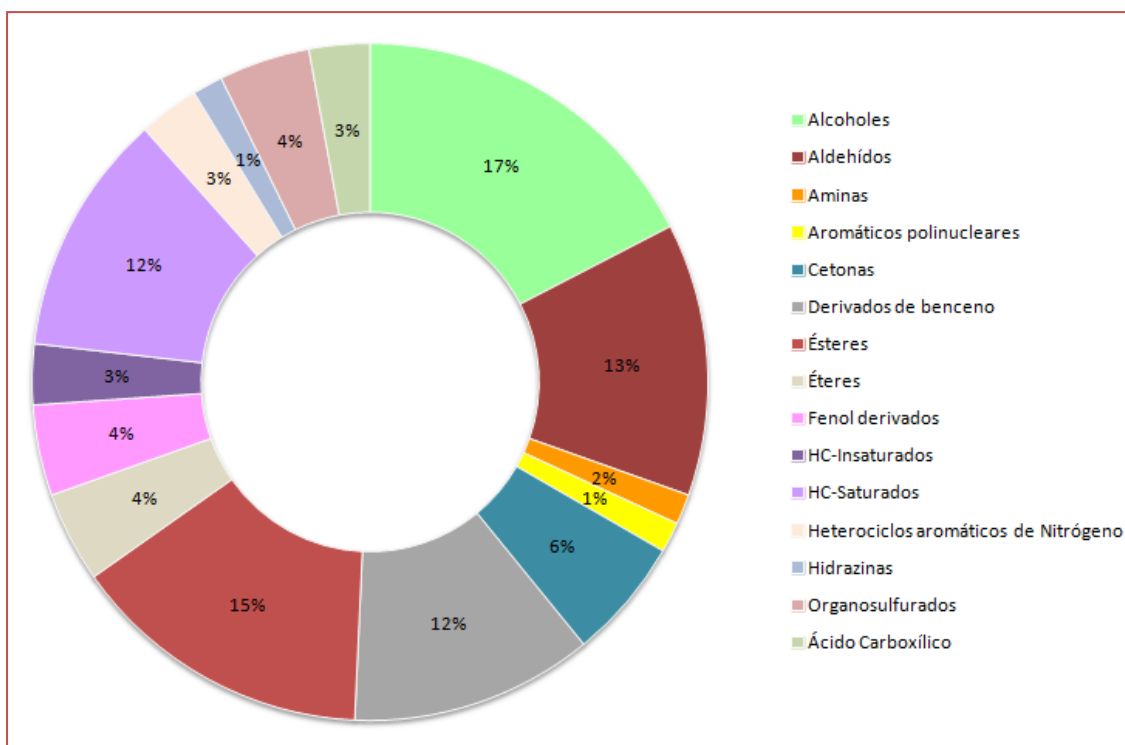


Figura 50. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (PLÁTANO)

En la figura 51 se muestran los resultados obtenidos mediante análisis PCA. Se diferencian 3 grupos de fibras en función del tipo de compuestos:

- Grupo I: Fibra azul clara.

- Grupo II: Fibras rosa, roja, gris y verde. La fibra verde-amarilla está próxima al límite que separa su grupo del III.
- Grupo III: Fibras verde amarilla, violeta clara y blanca.

En la figura 51b se muestra el comportamiento comparativo de las fibras, confirmándose lo descrito en la gráfica anterior. Los vectores indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento con respecto a las fibras del grupo. Sin embargo tiene comportamiento parecido a las fibras incluidas en el grupo III. Además, teniendo en cuenta que los puntos de la figura representan los compuestos volátiles más representativos del conjunto de compuestos sin perder a penas información, se observa que su distribución está repartida entre todas las fibras, distinguiéndose ligeramente dos grupos, tal y como se muestra en la misma figura.

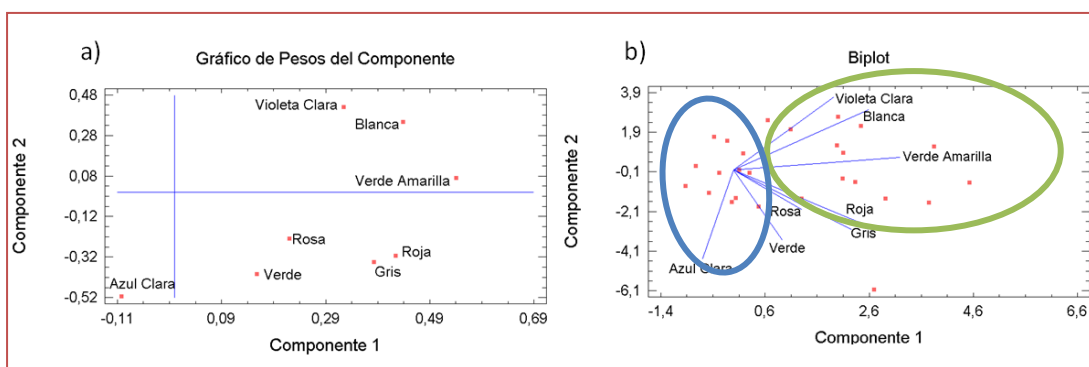


Figura 51. Resultados de estudio estadístico PCA (PLÁTANO)

4.1.2.2.6. Poa

En total, se han identificado 85 VOCs en total (tabla 35, Anexo I). A partir de los mismos, se elabora la gráfica 52, representando el número de compuestos detectados frente al tipo de fibra que los retiene, resaltando conclusiones relevantes como se describe a continuación en la clasificación de las fibras en tres grupos, en función del número de VOCs retenidos:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 53 detectados, seguida de la fibra rosa con 34. Los compuestos mayoritariamente retenidos en ambas fibras son

compuestos carbonílicos y alcoholes. Respecto a la fibra azul clara se observa que retiene compuestos muy variados, detectándose uno o más de un compuesto de cada tipo de compuestos divididos por grupos funcionales, excepto como en ocasiones anteriores, los compuestos nitrogenados, como las aminas o heterociclos aromáticos de nitrógeno, aunque sí que retiene amidas, probablemente por la presencia de oxígeno en este grupo funcional ($R-CONH_2$). Además, presenta una gran afinidad por los éteres y una afinidad exclusiva por los compuestos heterocíclicos aromáticos de oxígeno y los aromáticos polinucleares.

- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras gris, blanca y verde-amarilla retienen 28, 27 y 21, respectivamente. Los grupos funcionales principalmente retenidos son compuestos carbonílicos para la fibra gris, siendo mayoritarios los aldehídos, ésteres y alcoholes para la fibra blanca y alcoholes para la fibra verde-amarilla. Cabe destacar el comportamiento observado en el gráfico entre las fibras gris y rosa. Ambas aparecen detectando los mismos tipos de compuestos según su grupo funcional, excepto los éteres, retenidos por la fibra gris y no por la fibra rosa, y los fenol derivados, retenidos solo por la fibra rosa y no por la fibra gris. En el estudio estadístico de PCA presentado más adelante, ambas fibras aparecen en el mismo grupo. Respecto a la fibra blanca se observa una afinidad exclusiva a los Isocianatos.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras violeta clara, roja y verde retienen 15, 6 y 1 compuestos, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos son alcoholes para la fibra violeta clara, ésteres para la fibra roja e hidrocarburos saturados para la fibra verde. El compuesto retenido por la fibra verde es el tridecano, que también detectado con la fibra verde-amarillo. En consecuencia, se podría prescindir únicamente de esta fibra.

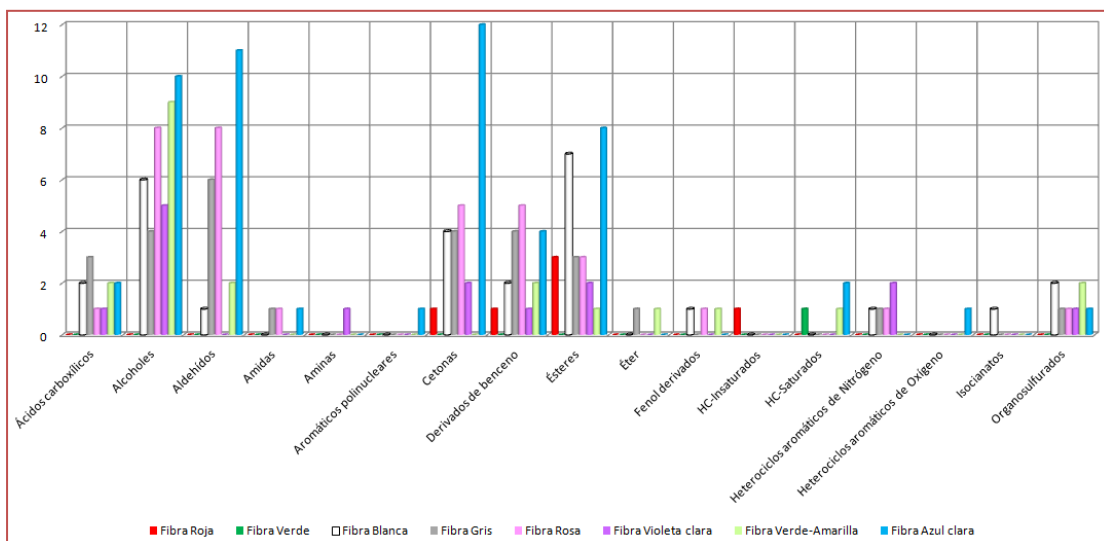


Figura 52. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (POA).

En el gráfico 53 se presenta el tipo de compuestos orgánicos identificados globalmente. Como puede observarse, el tipo de compuestos mayoritarios son los compuestos carbonílicos, alcoholes y ésteres con un contenido del 34%, 21% y 13%, respectivamente. La mayoría de ellos son de origen natural. Respecto a los hidrocarburos, la totalidad de los saturados detectados son lineales y el clasificado como hidrocarburos insaturados es el alquino 2-nonino. Aunque no se dispone de bibliografía sobre este compuesto exactamente, sí se ha encontrado documentación relativa al isómero 1-nonino, que está relacionado con el humo del tabaco [116](#).

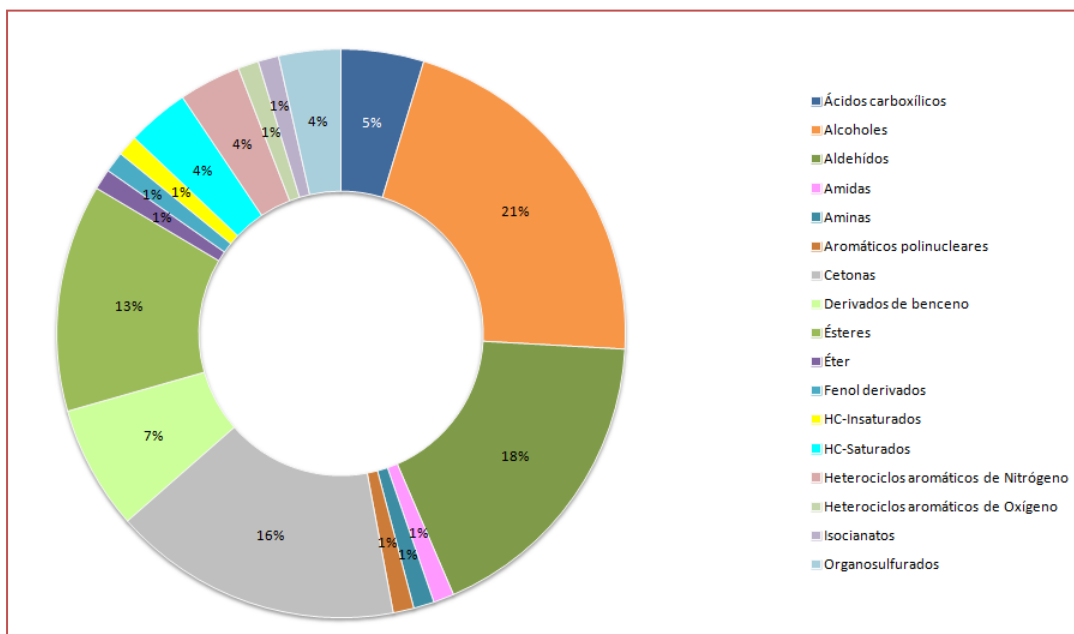


Figura 53. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (POA)

En la figura 54 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA. En la figura 54a se pueden diferenciar 4 grupos de fibras en función del tipo de VOCs:

- Grupo I: Fibra verde.
- Grupo II: Fibra azul clara.
- Grupo III: Fibras verde amarilla, violeta clara y blanca. En este grupo se observa que las fibras blanca y verde-amarilla se encuentran en el límite con el grupo IV.
- Grupo IV: Fibras roja, rosa y gris. En el párrafo anterior, se ha comentado la complementariedad observada entre las fibras rosa y gris.

Bien es cierto que los grupos II y III no se encuentran muy alejados en el gráfico y, por tanto, su capacidad de retención no es muy diferente. Este hecho se confirma también en la figura 51. Los vectores de dicha figura indican que las fibras verde-amarilla, violeta clara, blanca, gris, rosa y roja tienen comportamientos parecidos.

Atendiendo a la distribución de los VOCs más representativos del total de compuestos identificados para este polen (puntos de la figura 54b) se observa cómo hay mayor número de ellos repartidos entre las fibras de los grupos III y IV. Por otra parte, se puede apreciar dos agrupaciones de puntos, tal y como se muestra en dicha figura.

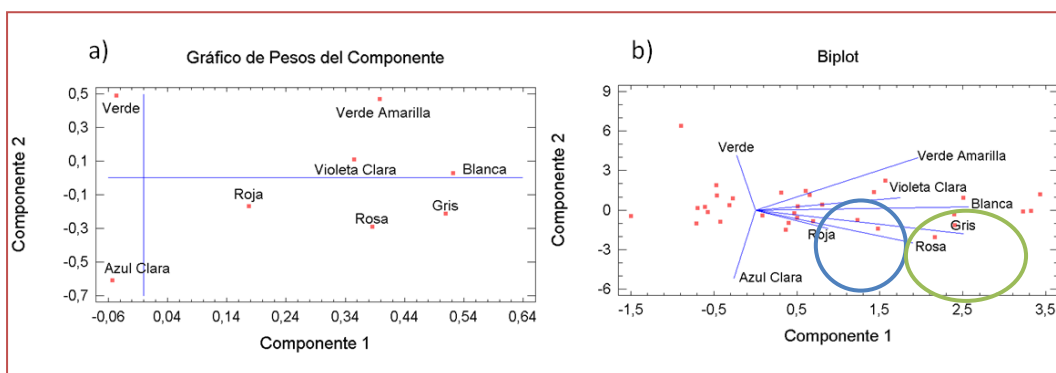


Figura 54. Resultados de estudio estadístico PCA (POA)

4.1.2.2.7. Quercus

En total, se han identificado 76 VOCs (tabla 36, Anexo I). A la vista de los resultados se pueden clasificar a las fibras en tres grupos, atendiendo al número de compuestos retenidos:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 43 detectados, seguida de la fibra rosa con 30. Los compuestos principalmente retenidos para ambas fibras según su grupo funcional principal son aldehídos y ésteres.
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras gris, violeta clara, verde-amarilla y blanca retienen 24, 24, 22 y 22, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos por la fibra gris son aldehídos. En el caso de las fibras verde-amarilla y blanca son los ésteres. La fibra violeta clara retiene principalmente ácidos carboxílicos, alcoholes y ésteres.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras, roja y verde retienen 12 y 6 compuestos, respectivamente. En ambas fibras se retienen los HC-

saturados de forma mayoritaria, pero en el caso de la fibra roja además los VOCs clasificados como ésteres. Dentro de los hidrocarburos saturados retenidos por la fibra verde, al menos dos son exclusivamente retenidos por la misma. En consecuencia, no se puede descartar esta fibra para un estudio completo.

Cabe destacar que en el caso de los compuestos cetónicos se observa como son detectados en todas las fibras y son cetonas de cadenas comprendidas entre 8 y 15 carbonos. En el caso de los aldehídos se observa una misma retención para las fibras rosa y gris, reteniendo los mismos compuestos aldehídicos (gráfico 55). En el apartado 4.1.3 se discute de una forma global el comportamiento de las fibras en relación con el tipo de fase estacionaria.

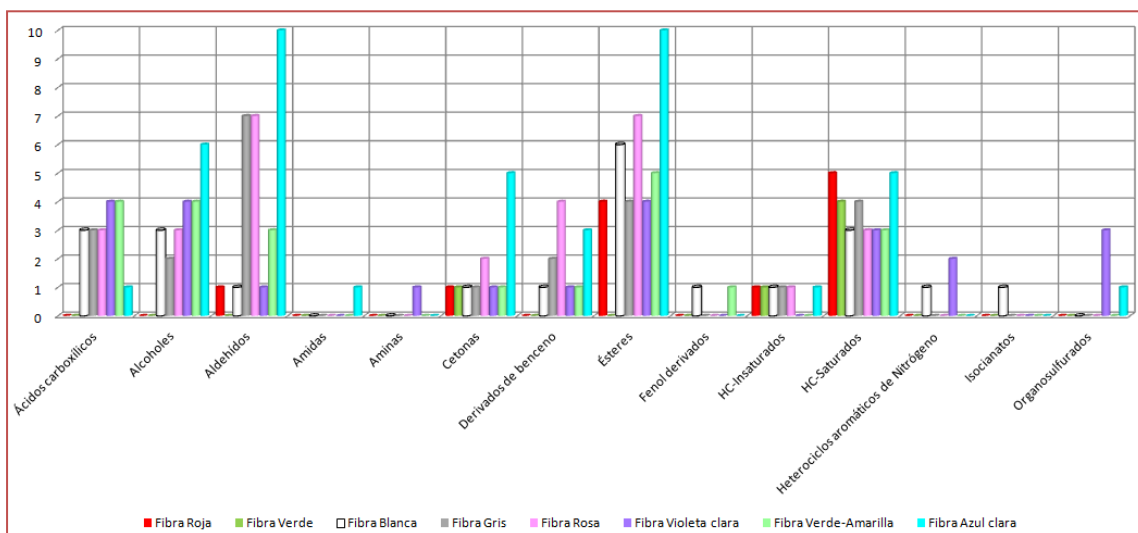


Figura 55. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (QUERCUS)

En el gráfico 56 se muestra el tipo de compuestos orgánicos identificados. Como puede observarse, los compuestos mayoritarios son ésteres (18%), hidrocarburos saturados (17%), alcoholes (15%) y aldehídos (15%). Los compuestos como alcoholes y/o aldehídos son considerados de origen natural, y cabe destacar que aunque no se ha detectado ningún compuesto aromático polinuclear, tales como el naftaleno y/o sus derivados, sí se han detectado derivados de benceno, como los BTEX. Por otro lado, en este

polen también se ha detectado el 2,4-diisocianato-1-metil-benceno, relacionado con la fabricación del poliuretano **115**.

Es importante el elevado contenido en hidrocarburos saturados, de los cuales el 85% son lineales y el resto presentan ramificaciones. En este grupo, compuestos identificados como eicosano, heptano y 10-metilnonadecano, han podido relacionarse directamente con los gases de combustión emitidos por los vehículos (apartado 4.3)

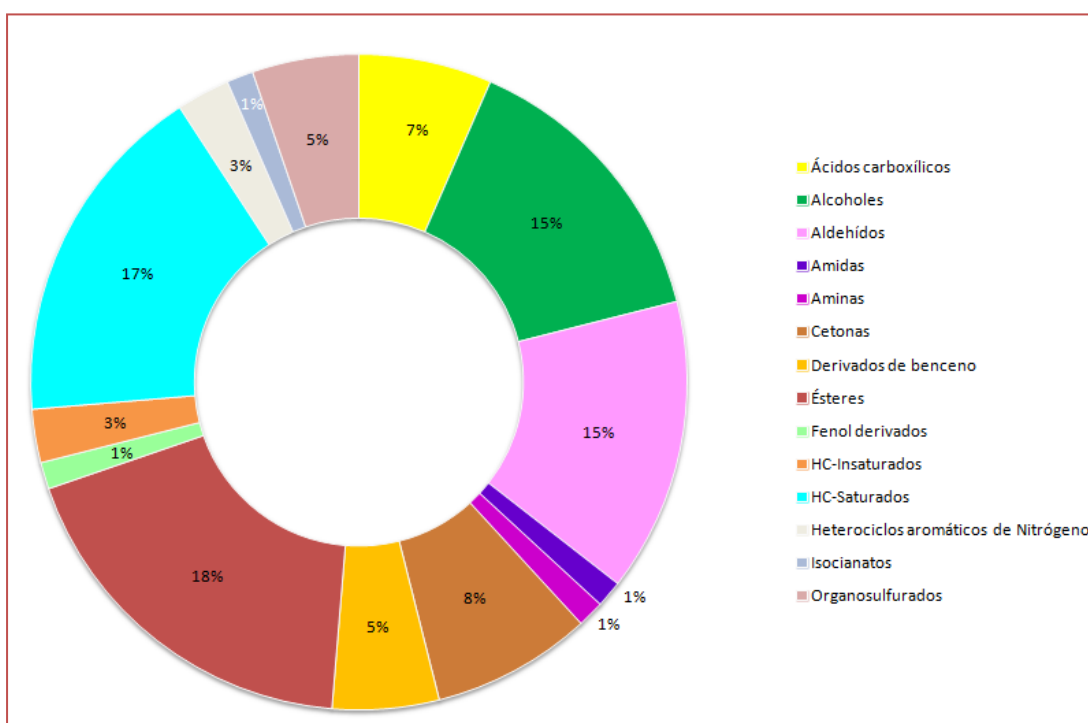


Figura 56. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (QUERCUS)

En la figura 57 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA. En la figura 57a) se diferencian 3 grupos de fibras atendiendo al tipo de VOCs retenidos:

- Grupo I: Fibra verde

- Grupo II: Fibras verde-amarilla, violeta clara y blanca. Como puede observarse, la fibra blanca tiene un comportamiento muy similar al de la fibra verde-amarilla. Este hecho también se verifica en las figuras 55 y 57b). En la primera, se observa como retienen prácticamente el mismo tipo de compuestos excepto los hidrocarburos insaturados, que solo son detectados en la fibra blanca. En la segunda figura, se observa como los vectores de ambas fibras se superponen, coincidiendo en una única recta.
- Grupo III: Fibras azul clara, rosa, roja y gris. Cabe destacar que la fibra azul clara está en el límite del que sería un cuarto grupo, por lo que se puede deducir que su comportamiento es el más diferente dentro de este grupo.

En la figura 57b) muestra el comportamiento comparativo entre fibras. Los vectores representados en forma de rectas indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento opuesto a las fibras del grupo II. Observando la distribución de los puntos en el gráfico se observa que están muy repartidos entre las fibras.

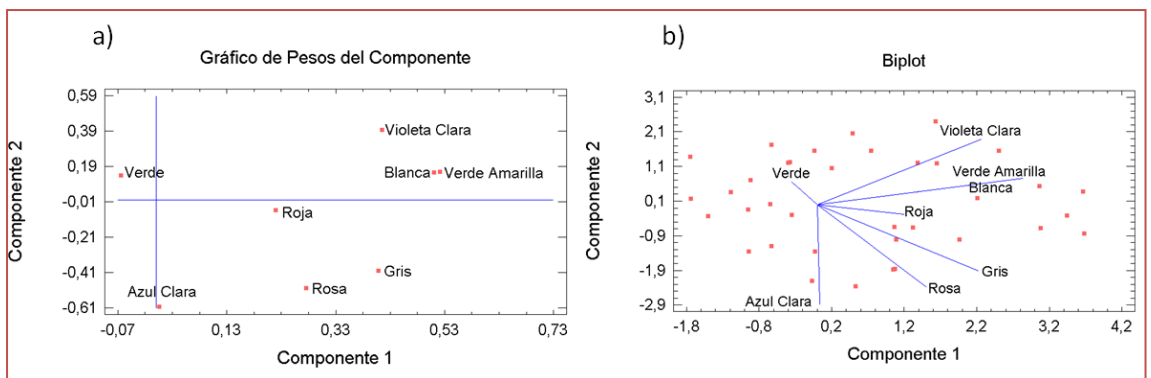


Figura 57. Resultados de estudio estadístico PCA (QUERCUS)

4.1.2.2.8. Fraxinius

En total, se han identificado 58 VOCs (tabla 37, Anexo I) y a partir de ellos se elabora la gráfica 58, donde se representan el número de compuestos, clasificados según su grupo funcional, frente a las fibras por los que han sido retenidos. A continuación, se presenta una clasificación de las fibras en función del número VOCs retenido:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 31 detectados, de los cuales la mayoría son alcoholes. Esta fibra retiene uno o más de un compuesto de cada tipo de compuestos divididos por grupos funcionales, excepto aminas, derivados de fenol, heterociclos aromáticos de nitrógeno e Isocianatos. Además presenta una afinidad similar que las fibras gris y violeta clara por los compuestos que contienen azufre.
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras rosa, gris, violeta clara, blanca verde-amarilla y retienen 19, 17, 15, 14 y 13, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos por estas fibras son derivados de becenos, cetonas, ésteres, hidrocarburos saturados y alcoholes.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras, roja y verde retienen 3 compuestos cada una. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos en la fibra roja son ésteres. Por último, los grupos funcionales de los compuestos orgánicos mayoritariamente retenidos para la fibra verde son hidrocarburos saturados. Respecto a los compuestos 3 compuestos identificados en la fibra verde una acetona es retenida de forma exclusiva, mientras que todos los compuestos identificados en la fibra roja son retenidos a su vez, al menos, por la fibra gris. En consecuencia, la fibra roja es prescindible por no aportar información cualitativa diferente a la obtenida con las otras fibras.

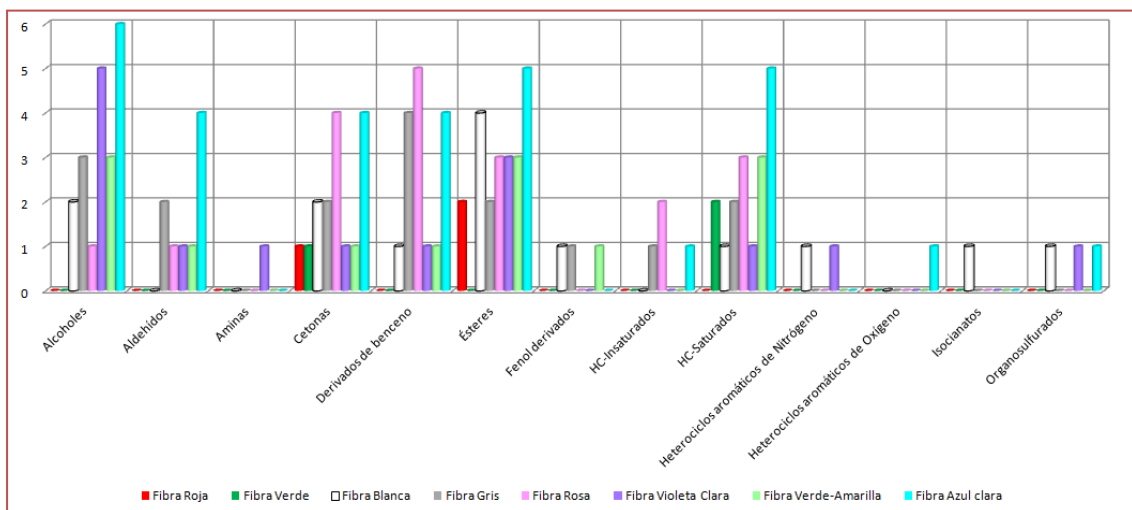


Figura 58. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (FRAXINIUS)

En el gráfico 59 se presenta el tipo de compuestos orgánicos identificados. El tipo de compuestos mayoritarios son los alcoholes y hidrocarburos saturados con un contenido del 22% y 17%, respectivamente. No se han detectado ni derivados de naftaleno ni ácidos carboxílicos. Como contaminantes ya mencionados anteriormente identificados en otros pólenes, se detecta la presencia de BTEX y el 2,4-diisocianato-1-metil-benceno, relacionado con la fabricación del poliuretano. El contenido elevado de hidrocarburos es también relevante, ya que la mayoría de ellos son probablemente contaminantes procedentes de gases de combustión. De ellos, el 70% son hidrocarburos alifáticos lineales.

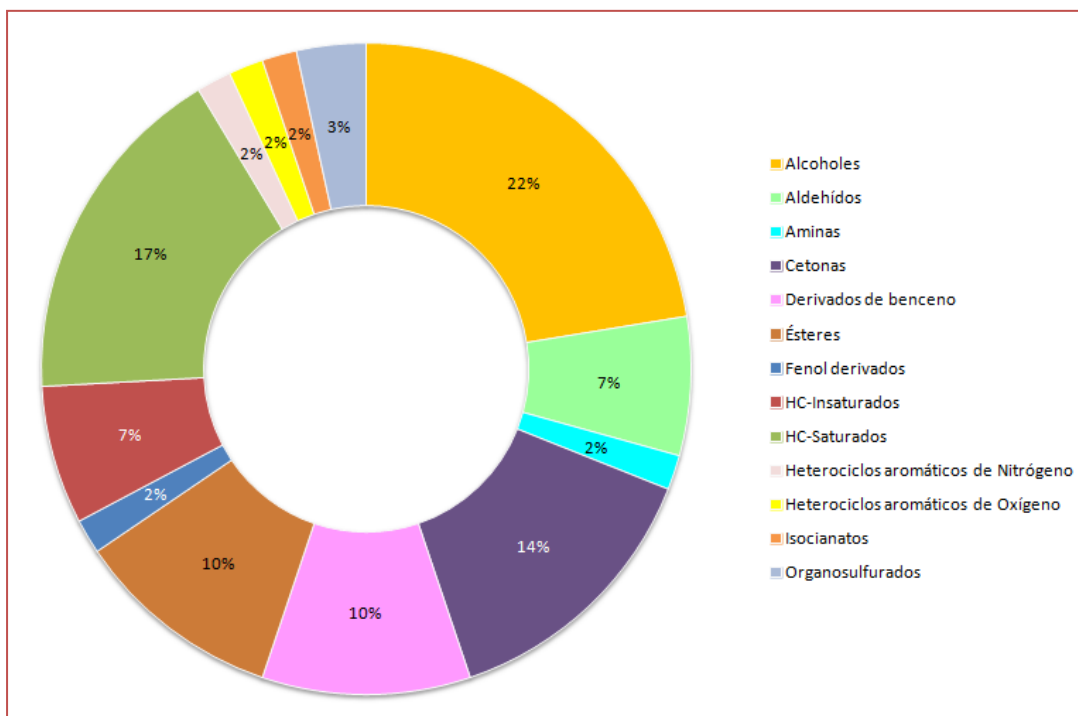


Figura 59. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (FRAXINIUS)

En la figura 60 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA. En la figura 60a) se diferencian 3 grupos de fibras en función del tipo de VOCs:

- Grupo I: Fibra azul clara.
- Grupo II: Fibras verde, verde-amarilla, violeta clara y blanca. Como puede observarse, la fibra blanca está justo en el límite entre los grupos II y III. Por otra parte, la fibra verde parece presentar comportamiento diferente dentro de este grupo.
- Grupo III: Fibras rosa, roja y gris. Cabe destacar que la fibra rosa parece presentar comportamiento diferente dentro de este grupo. Las fibras roja y gris están más próximas entre sí.

En la figura 60b) puede observarse el comportamiento comparativo de las fibras, confirmando la información descrita en el gráfico anterior. Los vectores indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento contrario a la fibra verde. Aquí se hace visualmente más evidente que las fibras violeta clara, verde-amarilla, blanca, roja y gris tienen comportamientos parecidos.

Atendiendo a la distribución de los VOCs más representativos en torno a las fibras, se observa cómo están muy repartidos entre las mismas, pudiéndose diferenciar una mayoría alrededor de las fibras azul clara, verde y violeta clara.

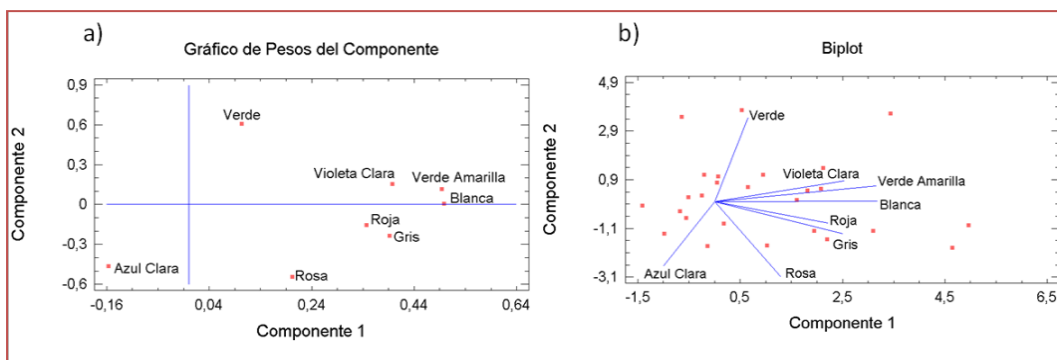


Figura 60. Resultados de estudio estadístico PCA (FRAXINIUS)

4.1.2.2.9. Olivo

En total se han identificado 84 VOCs en esta muestra. Con los resultados presentados en la tabla 38 (Anexo I) se elabora la gráfica 61, en la cual se ha representado el número de compuestos, clasificados según su grupo funcional, frente a las fibras por los que han sido retenidos, pudiéndose agrupar las fibras según el número de VOCs detectados, comentando aspectos de afinidad en cada caso:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 43 detectados, seguida de la fibra gris con 30. Los compuestos retenidos mayoritariamente por la fibra azul clara son compuestos carbonílicos, en concreto los aldehídos, y alcoholes. Respecto a la fibra gris, los compuestos con grupos funcionales principalmente retenidos son aldehídos y ésteres. En la figura se observa que de los 15 tipos de compuestos según su grupo principal, las fibras azul clara y gris son las que más tipo de compuestos diferentes retienen. En concreto, la fibra azul clara retiene 11 tipos diferentes y la fibra gris 10. Las fibras que complementan a estas dos son las fibras blanca y violeta clara

- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras verde-amarilla, blanca y rosa retienen 24, 23 y 20, respectivamente. Los VOCs con grupos funcionales mayoritariamente retenidos por estas fibras son hidrocarburos saturados, ésteres y aldehídos en la fibra verde-amarilla, ésteres en la fibra blanca y compuestos cetónicos en la fibra rosa.
- **Con capacidad de retención baja:** las fibras violeta clara, roja y verde retienen 18, 13 y 1 compuestos, respectivamente. La fibra violeta clara presenta gran afinidad por compuestos polares tales como alcoholes, aldehídos o ésteres, siendo el mayoritario el grupo de los alcoholes. En el caso de la fibra roja retiene mayoritariamente a hidrocarburos saturados y compuestos cetónicos. Por último, la fibra verde retiene únicamente un hidrocarburo saturado, el 7-propyl- tridecano, que solo se ha detectado con esta fibra. Por tanto, no se puede descartar esta ni ninguna otra fibra para el estudio completo.

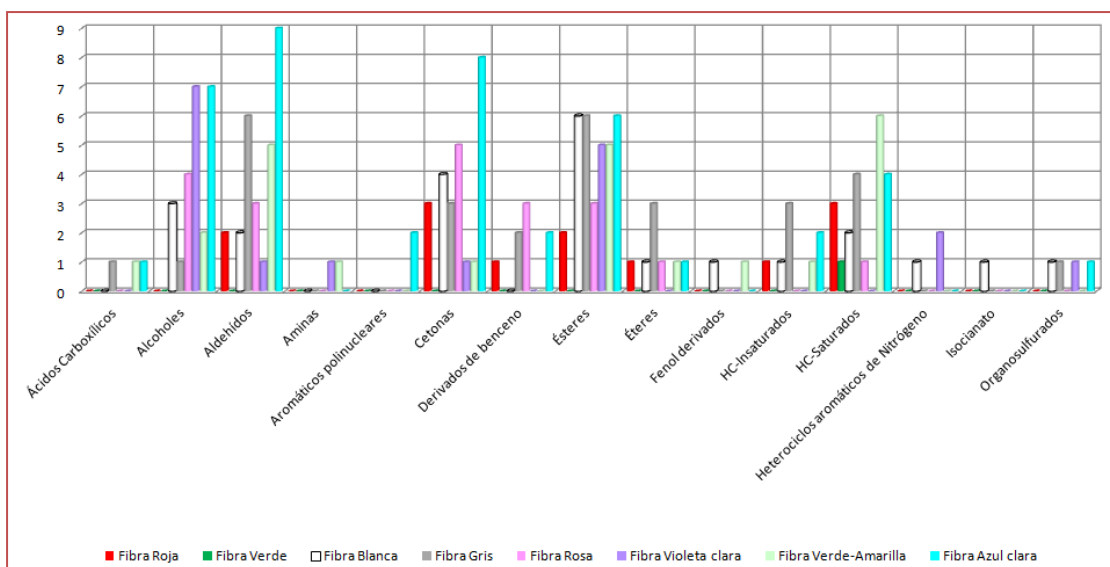


Figura 61. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (OLIVO)

En el gráfico 62 se resume el tipo de compuestos orgánicos identificados. Como puede observarse, en este polen el tipo de compuestos mayoritarios son los compuestos carbonílicos (33%), alcoholes (16%) y ésteres

(14%). Dentro de los derivados de benceno (6%), a parte de los BTEX, cabe destacar la presencia de dietiltoluidina. Este compuesto es un repelente para insectos y, aunque es considerado como un compuesto de baja toxicidad para consumo humano según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) **117**, no parece ser un VOCs natural del polen y podría considerarse como contaminante. Por otra parte, no se dispone de bibliografía del impacto de este compuesto en los insectos polinizadores. Este dato es especialmente importante en este polen, ya que según se ha mencionado anteriormente, el olivo es un árbol cuya estrategia de fecundación es entomófila, pero al generar tanta cantidad de polen, también es anemófila. En este sentido, como ya se ha descrito en la introducción, el polen entomófilo posee mayor capacidad adherente que el polen anemófilo, pudiendo ser un factor importante en la adhesión en superficie de contaminantes. Los contaminantes más importantes identificados son:

- Derivados de benceno (6%). BTEX y otros
- Aromáticos polinucleares (2%) siendo derivados del naftaleno.
- Isocianatos relacionados con el poliuretano.
- Aminas (2%), dentro de la cual cabe destacar la presencia de un derivado de morfina. La morfina y muchos derivados son aditivos comunes a nivel de ppm, para el ajuste de pH tanto en los sistemas de vapor de centrales eléctricas de combustibles fósiles y nucleares. Se utilizan debido a que sus volatilidades son aproximadamente igual que la del agua, por lo se distribuyen uniformemente tanto en las fases de agua líquida como vapor. Su capacidad de ajuste del pH proporcionan protección contra la corrosión. Otra aplicación importante es el uso de estos derivados como recubrimiento de las frutas, aunque la UE ha prohibido su uso para este fin **118, 119**

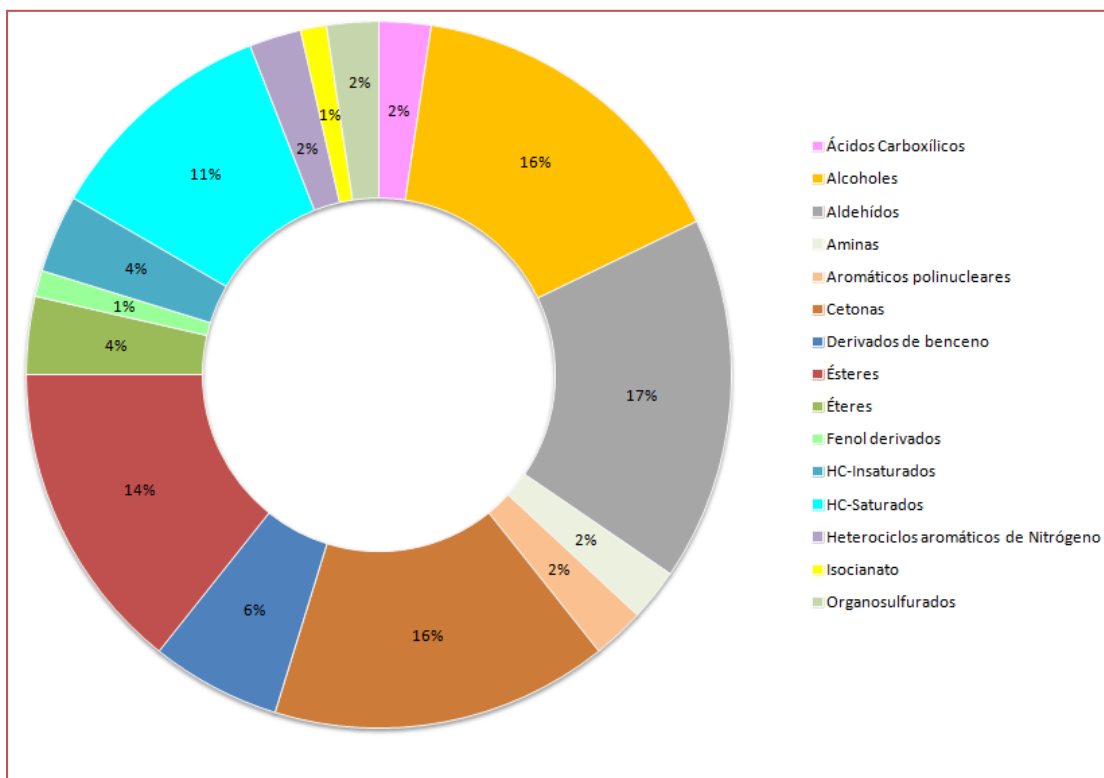


Figura 62. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (OLIVO)

En la figura 63 se muestran los resultados obtenidos en el análisis PCA. En la figura 63a) se diferencian 4 grupos de fibras en función del tipo de VOCs:

- Grupo I: Fibra verde
- Grupo II: Fibra violeta clara
- Grupo III: Fibras azul clara, rosa, roja, y blanca. Como puede observarse dentro de este grupo, se diferencia dos agrupaciones: una compuesta por las fibras azul claro y rosa y otra por las fibras roja y blanca.
- Grupo IV: Fibras gris y verde-amarilla.

En la figura 63b) puede observarse el comportamiento comparativo de las fibras, confirmándose la información obtenida en el gráfico anterior. Los vectores de dicha figura indican que fibra violeta clara tiene un comportamiento opuesto a la fibra azul clara. Por el contrario, las fibras gris y verde-amarilla tienen comportamientos similares entre sí. Atendiendo a la distribución de los VOCs más representativos del total de compuestos

identificados se observa cómo están repartidos más o menos de una forma homogénea en la parte central del gráfico.

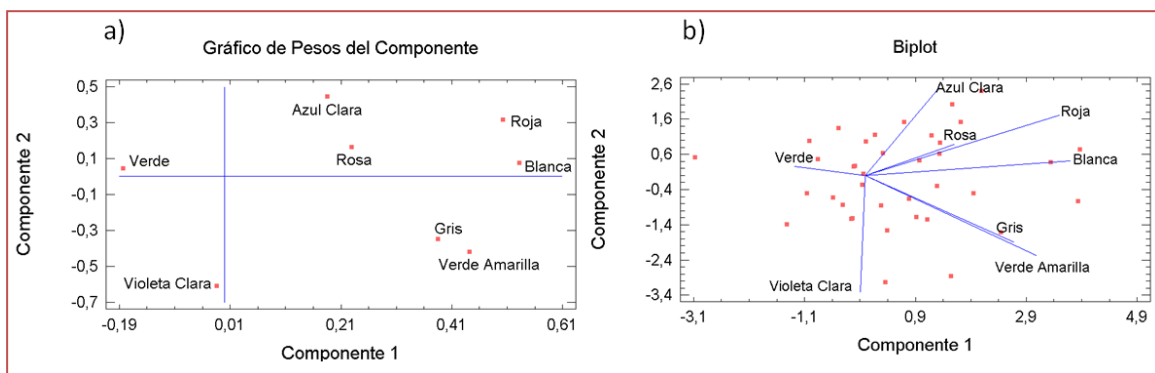


Figura 63. Resultados de estudio estadístico PCA (OLIVO)

4.1.2.2.10. Populus

En este polen se han identificado 61 VOCs en total (tabla 39, Anexo I). Con esta información se elabora la gráfica de la figura 64, representando el número de compuestos detectados frente al tipo de fibra que los retiene, permitiendo clasificar a las fibras en tres grupos, en función del número de VOCs retenidos:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 38 detectados, seguida de la fibra rosa con 27. Los compuestos retenidos mayoritariamente en estas fibras son los ésteres y alcoholes para la fibra azul clara y los ésteres y derivados de benceno y ésteres para la fibra rosa. En la figura 64 se observa que en el caso de las fibras rosa y gris presentan afinidades similares por los ácidos carboxílicos, derivados de fenol, hidrocarburos saturados y compuestos organosulfurados
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras blanca, violeta clara, verde-amarilla y gris retienen 15, 15, 12 y 11, respectivamente. Los grupos funcionales mayoritariamente retenidos son ésteres; alcoholes; derivados de benceno y derivados de fenol y aldehídos derivados de benceno y ésteres, respectivamente. Cabe destacar la

afinidad que presentan las fibras blanca, verde-amarilla y violeta clara por los compuestos organosulfurados.

- **Con capacidad de retención baja:** las fibras roja y verde retienen 2 y 1 compuestos, respectivamente. Para estas fibras no hay un tipo de compuesto mayoritario, repartiéndose en derivados de benceno y ésteres e hidrocarburos saturados, respectivamente. De hecho, la fibra verde retiene sólo los compuestos del tipo hidrocarburos saturados, en concreto, se detecta el pentadecano, que también se identifica en las fibras gris y verde-amarilla, por lo que se puede prescindir de la fibra verde ya que no aporta nueva información sobre los VOCs en este polen. Lo mismo sucede con la fibra roja.

En la figura 64, donde se visualizan estos resultados globalmente, se observa que los derivados de benceno son identificados por todas las fibras excepto por la fibra verde. En el apartado 4.1.3 se discute de una forma global el comportamiento de las fibras en relación con el tipo de fase estacionaria.

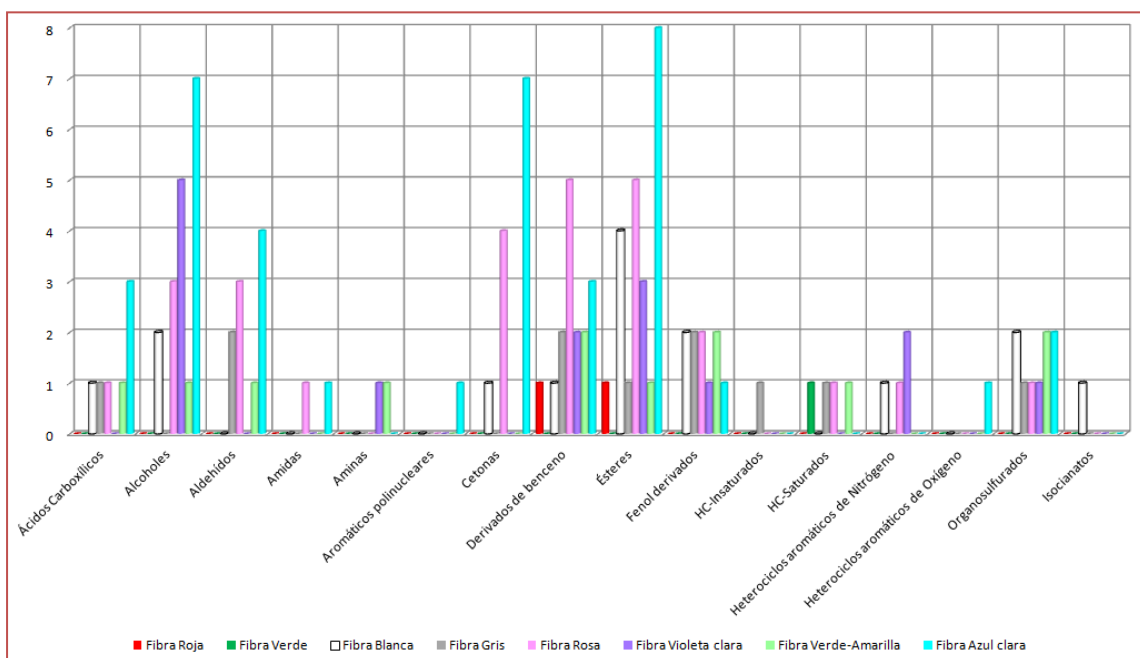


Figura 64. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (POPULUS)

En el gráfico 65 se representa el tipo de compuestos orgánicos identificados globalmente. Como puede observarse el tipo de compuestos mayoritarios son alcoholes (20%), compuestos carbonílicos (19%) y ésteres (18%). Dentro de los compuestos heterocíclicos aromáticos de nitrógeno se encuentran derivados de imidazoles. A pesar de que no se dispone de bibliografía concisa respecto a los compuestos detectados, por lo general tienen propiedades anti-fúngicas utilizadas para tal fin en la agricultura¹²⁰, a parte de las aplicaciones farmacéuticas ya comentadas.

El grupo denominado heterociclos aromáticos de oxígeno corresponde al 2-pentil furano. Este compuesto es de origen natural identificado en muchos vegetales como producto de descomposición de aceites naturales (soja o maíz entre otros)¹²¹.

Como en otros pólenes, se detectan el dimetil-sulfóxido y dimetil-sulfona dentro del grupo de organosulfurados, algunos compuestos del grupo de los BTEX y derivados de naftalenos.

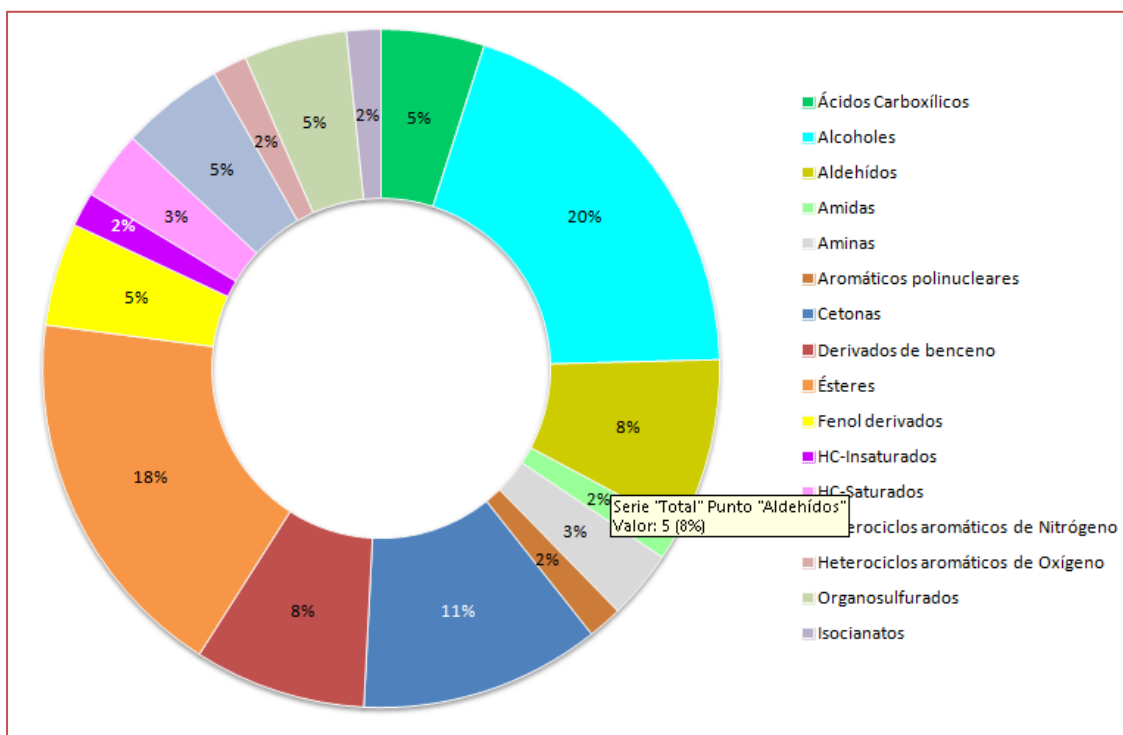


Figura 65. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (POPULUS)

En la figura 66 se muestran los resultados obtenidos en el análisis estadístico mediante PCA. En la figura 66a) se diferencian 3 grupos de fibras en función del tipo de VOCs:

- Grupo I: Fibra azul clara.
- Grupo II: Fibras verde, violeta clara, verde-amarilla y gris. Como puede observarse, la fibra gris tiene un comportamiento próximo al del grupo III.
- Grupo III: Fibras rosa, roja y blanca. Dentro de este grupo, la fibra rosa está alejada a las otras dos, estando muy próximo a la azul clara.

En la figura 66b) puede observarse el comportamiento comparativo de las fibras. Los vectores de dicha figura indican que la fibra azul clara tiene un comportamiento opuesto teniendo en cuenta el tipo de VOCs retenidos al de la fibra verde. Por otra parte se observa como las fibras violeta clara y verde-amarilla y las fibras blanca y roja tienen comportamientos similares entre sí, confirmando la información obtenido en el gráfico de la figura 64. Atendiendo a cómo están distribuidos los VOCs más representativos se observan dos ligeras aglomeraciones tal y como se indica en la misma figura.

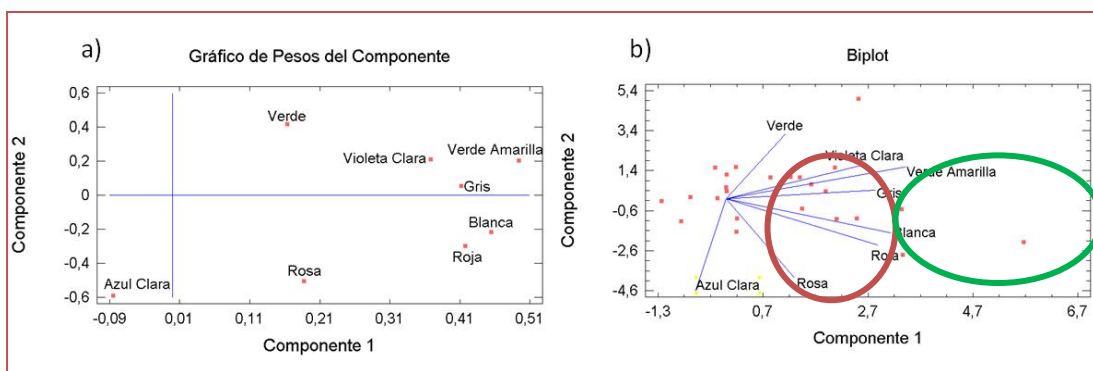


Figura 66. Resultados de estudio estadístico PCA (POPULUS)

4.1.2.2.11. Arizónica

En la tabla 40 (Anexo I) se presentan los resultados obtenidos en la identificación y semicuantificación de los 54 VOCs contenidos en el polen Arizónica. Con esta información se elabora el gráfico 67, representado el número de compuestos identificados frente al tipo de fibra que los retiene y se realiza una clasificación de las fibras utilizadas en función del número de VOCs que retienen:

- **Con capacidad de retención alta:** la fibra azul clara es la que más compuestos retiene, con 34 identificaciones. Los compuestos retenidos mayoritariamente son derivados de benceno.
- **Con capacidad de retención intermedia:** las fibras rosa, blanca, gris, violeta clara y verde-amarilla retienen 17, 16, 14, 14 y 12, respectivamente. Los VOCs con grupos funcionales mayoritariamente retenidos para las fibras blanca, rosa y gris son los derivados del benceno; para la fibra violeta clara los alcoholes y para la fibra verde-amarilla los ésteres. Respecto a la fibra blanca se observa una retención exclusiva a los compuestos clasificados como isocianatos y organosulfurados
- **Fibras con capacidad de retención baja según el número de VOCs detectados:** las fibras roja y verde retienen 4 y 1 compuestos, respectivamente. Los compuestos con grupos funcionales mayoritariamente retenidos en la fibra roja son los ésteres y la fibra verde retiene únicamente el tridecano, que también es retenido por la fibra verde-amarilla. Lo mismo sucede con la fibra roja, que detecta compuestos comunes con otras fibras, pudiéndose descartar. En consecuencia, ambas fibras son prescindibles para un screening completo para este polen.

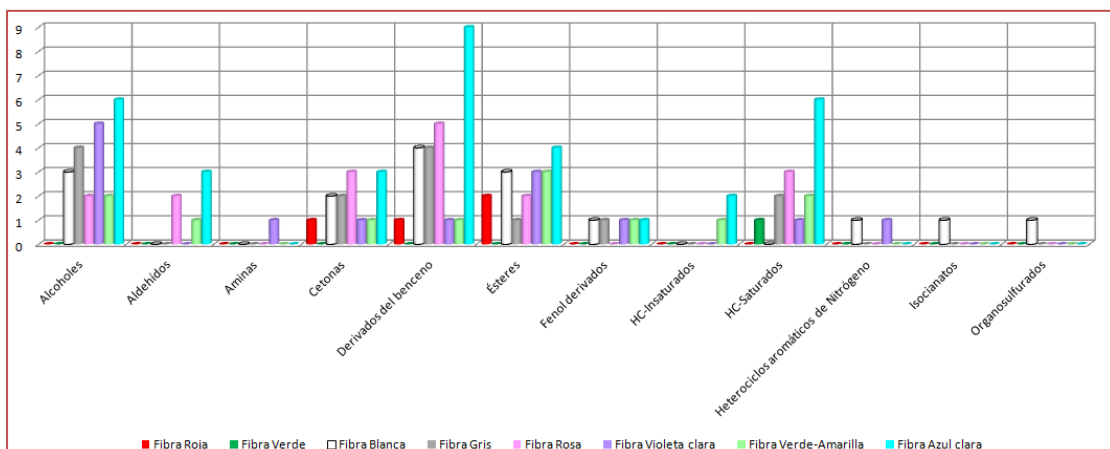


Figura 67. Tipo de compuestos retenidos por cada fibra (ARIZÓNICA)

En el gráfico 68 se estudia el tipo de compuestos orgánicos identificados en este polen. El tipo de compuestos mayoritarios son los alcoholes (22%), hidrocarburos saturados (18%) y derivados de benceno (17%), los cuales son retenidos por todas las fibras, excepto por la fibra verde (gráfico 67). Esto puede ser debido, en parte, a su elevado contenido en este polen. Cabe destacar la elevada presencia de compuestos no considerados como naturales en los pólenes, pudiendo proceder de compuestos antropogénicos. Dentro de los hidrocarburos saturados el 80% son alifáticos lineales, 10% son cíclicos y el resto alifáticos ramificados. Algunos de los alifáticos lineales han sido identificados como contaminantes de los vehículos, tal y como se verá en el apartado 4.3. Del 17% de los derivados de benceno identificados, el 56% son claramente de origen no natural, como son los BTEX y otros derivados del benceno. Por otra parte y como en otros pólenes, se identifica el dimetilsulfóxido y el isocianato relacionado con el poliuretano.

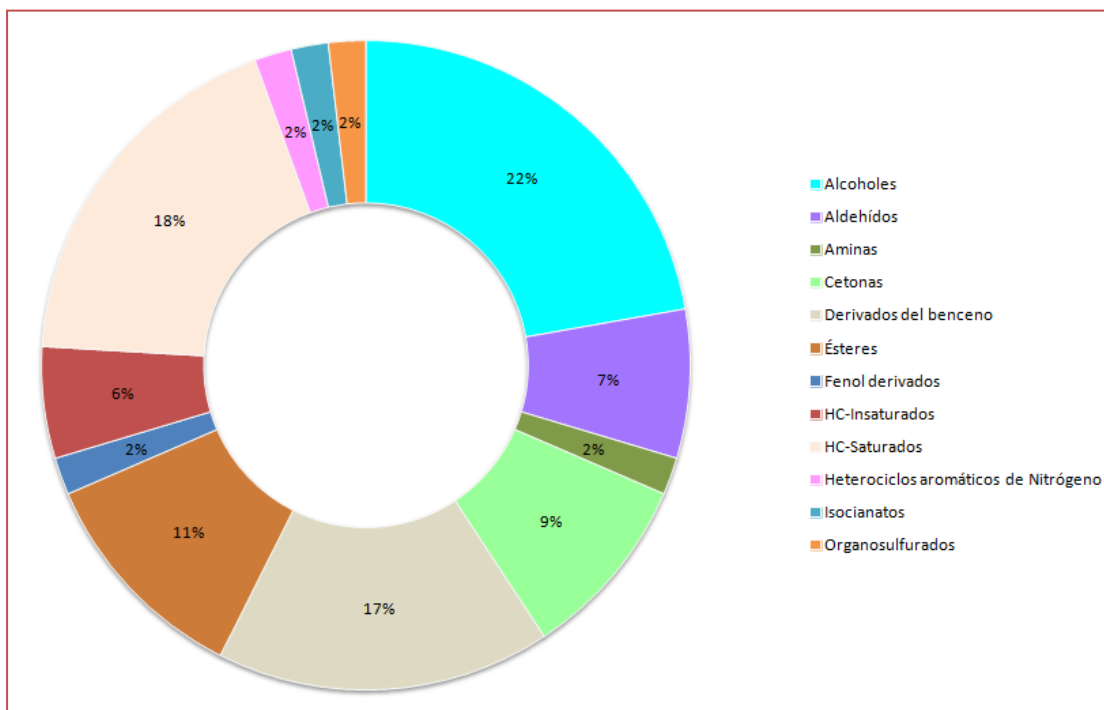


Figura 68. Contenido porcentual de VOCs según su grupo funcional (ARIZÓNICA)

En la figura 69 se muestran los resultados obtenidos en el análisis estadístico mediante PCA. En la figura 69a) se diferencian 4 grupos de fibras según el tipo de VOCs retenido:

- Grupo I: Fibra azul clara.
- Grupo II: Fibra verde.
- Grupo III: Fibras verde amarilla y violeta clara.
- Grupo IV: Fibras gris, rosa, roja y blanca, agrupadas dos a dos en función de su similitud de comportamiento.

En la figura 69b) puede observarse el comportamiento comparativo de las fibras. Los vectores de dicha figura indican confirman lo resaltado en el gráfico anterior y se observa que las fibras dentro de cada grupo tienen comportamientos similares. Atendiendo a la distribución de los VOCs más representativos se observa que éstos se encuentran distribuidos entre los cuatro grupos, localizándose una aglomeración entre las fibras verde y azul clara.

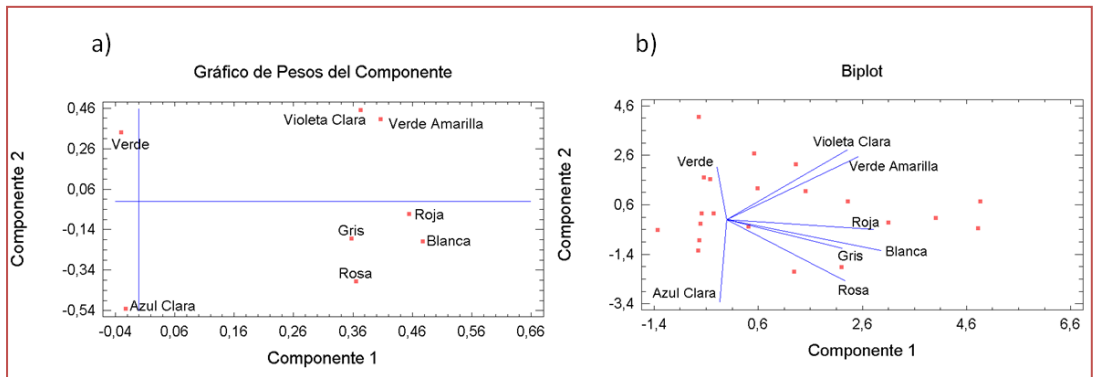


Figura 69. Resultados de estudio estadístico PCA (ARIZÓNICA)

4.1.3. Estudio del comportamiento de las fibras en los pólenes

A partir de los resultados obtenidos en la identificación de VOCs (Anexo I) y la información aportada en la tabla 9 sobre la composición de las fases estacionarias de las fibras para SPME se pueden realizar algunas consideraciones:

- Las fibras roja y verde son las que menos compuestos retienen. Las dos están constituidas de PDMS diferenciándose en el espesor, de 100 y 7 μm , respectivamente. Las fibras de PDMS son las más utilizadas y fueron las primeras introducidas en el mercado; por tanto, retiene compuestos apolares, aunque también se ha demostrado su buen comportamiento para compuestos de moderada polaridad, debido a su carácter universal por interacción con todo tipo de compuesto orgánico que contenga carbonos no totalmente sustituidos. En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como la de 100 μm , para compuestos con constantes de distribución bajas y de poco espesor para los que presenten constantes de distribución elevadas. La reducción del espesor de la fibra de 100 μm a 7 μm limita su aplicación a un número más reducido de analitos pero permite trabajar a temperaturas más elevadas, por su carácter apolar, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición superiores **122**. Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde la fibra roja de 7 μm ha retenido compuestos apolares, siendo en su gran mayoría hidrocarburos de cadena larga, de hasta 20 carbonos. Este tipo de compuestos tienen puntos de ebullición de hasta 300°C.
- La fibra azul clara es, por lo general, junto con la rosa, la que más compuestos retiene y de un amplio abanico de grupos funcionales. La fibra azul clara es una fibra de introducción relativamente reciente, constituida por un espesor 85 μm de una fase mixta formada por la combinación de materiales más porosos y adsorbentes, como es el carboxen (CAR), mezclados con PDMS. Esta fibra es adecuada para la retención de una amplia variedad de analitos volátiles. El Carboxen (CAR) es carbón que contiene macro, meso y micro poros. Las moléculas grandes no pueden penetrar en los micros poros, lo que facilita que las combinaciones CAR/PDMS permitan la extracción de pequeñas moléculas por mecanismo de exclusión. La combinación de CAR y PDMS

proporciona una mayor superficie y, por tanto, una mayor capacidad de retención. Esto explicaría la gran variedad y tamaños de compuestos que esta fibra ha retenido. Así, con esta fibra se han detectado compuestos tan diferentes en tamaño y polaridad como por ejemplo, el ácido acético y el hexadecano, en el polen del Plátano.

- La fibra blanca está constituido por PA, con carácter polar, con un espesor de 85 μm . El PA es un polímero sólido de baja densidad a temperatura ambiente, adecuado para la absorción de analitos polares (figura 70) **123, 124**. Esto concuerda con los resultados obtenidos ya que retiene compuestos polares con nitrógeno de forma casi exclusiva, como las hidracinas y los isocianatos. Otro tipo de compuestos retenidos por esta fibra, pero no exclusivamente por la misma, son algún BTEX, derivados de fenol y alcoholes.
- La fibra rosa está constituida por PDMS/DVB con un espesor de 65 μm . Como la azul clara, es una fibra mixta constituida por fases de materiales porosos y adsorbentes, como es el divinilbeneno (DVB) y PDMS. El DVB es un polímero sólido con poros más grandes que el CAR (presente en la fibra azul clara), lo que permite extraer moléculas de peso molecular superior que el anterior. Son adecuadas para la determinación de una amplia variedad de analitos volátiles. En este sentido podría parecerse en comportamiento a la fibra azul clara, de hecho es la que más compuestos retiene junto a la fibra azul clara. En general, en este tipo de fibras, las constantes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan para las fibras PDMS, muy posiblemente por su mayor superficie. Esto se hace evidente en el tipo de compuestos detectados de forma exclusiva por esta fibra, como son ciertos aldehídos en el polen Halapense, mostrando aspectos similares a la fibra azul clara.
- La fibra gris está compuesta por una triple combinación de CAR, DVB y PDMS con espesor 50/30 μm , que proporciona una mayor capacidad de retención. En esta fibra, una primera capa de PDMS/CAR se cubre con una segunda capa de PDMS/DVB. Las moléculas pequeñas con mayores coeficientes de difusión llegan a la capa interior más rápido y son adsorbidas por la fibra de CAR. Las moléculas más pesadas son retenidas en la capa exterior de DVB. Esta configuración facilita también

la desorción. En los pólenes ha mostrado afinidad por ciertos ésteres, hidrocarburos insaturados y organosulfurados.

- La fibra verde-amarilla está compuesta por CW/DVB con un espesor 70 μm . Esta fibra está descatalogada y se dejaron de fabricar por Supelco debido a que las fibras con CW presentaban problemas de reproducibilidad. No obstante, el laboratorio disponía de esta fibra y se realizaron los análisis para comprobar si existía diferencias en detección de nuevos VOCs.
- La fibra violeta clara ha sido desarrollada recientemente compuesta de 60 μm de polietilenglicol (PEG) como fase estacionaria; no contiene un polímero adsorbente consiguiendo así una fibra más polar y selectiva. La fase de PEG recubre un núcleo de metal inerte unido al montaje típico en otras fibras de acero inoxidable. Desde su desarrollo está reemplazando a las fibras CW-DVB en la extracción de compuestos polares como las p-cloroanilinas. De hecho es la única que retiene aminas en los pólenes, de una forma exclusiva y presenta, por lo general, una elevada afinidad por los alcoholes.

El mecanismo de absorción respecto al mecanismo de adsorción de los analitos en la fibra durante el proceso de extracción, ya que dependiendo del tipo de fibra va a predominar uno u otro. Tanto en las fibras de PDMS, PEG y PA, el mecanismo que predomina es el de absorción **123**, aunque algunos autores han indicado que la extracción de determinados analitos (sobre todo si son apolares) puede realizarse vía adsorción ya que existe cierta competitividad entre ambos efectos, mientras que en las fibras en las que se combina más de un polímero, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, debido a que son polímeros sólidos **125, 126**.

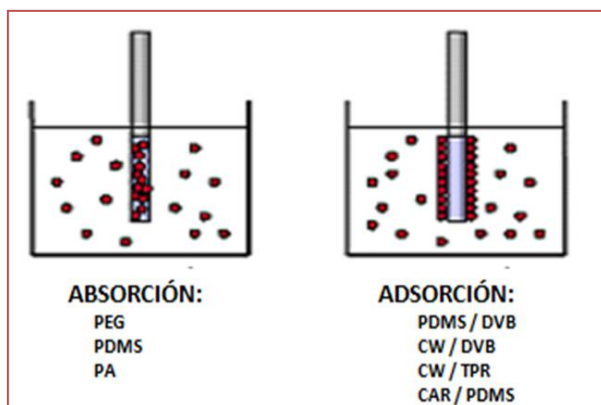


Figura 70. Clasificación de las fibras SPME según predomine el mecanismo de adsorción o absorción

Por último, se ha observado mediante estudio estadístico de PCA un comportamiento diferente de las fibras en cada polen. Esto puede atribuirse al efecto de competitividad existente entre los analitos. Este efecto puede producirse principalmente por dos motivos: 1) la presencia de un compuesto claramente mayoritario frente a los demás VOCs presentes, dicho compuesto envolvería mayoritariamente a la fibra (figura 71a)); 2) la presencia de numerosos compuestos de concentraciones parecidas y que compiten entre sí por la retención (figura 71b)). En este sentido es importante considerar que cuando los compuestos a retener y la fibra son apolares, las interacciones son débiles e inespecíficas y la desorción es favorable; los picos cromatográficos suelen ser estrechos. Sin embargo, las retenciones entre compuestos y fibras polares son más fuertes por la formación de enlaces de hidrógeno y suelen dar picos cromatográficos más anchos que en el caso anterior. Este tipo de interacciones es importante en la competitividad entre los compuestos y la fibra.

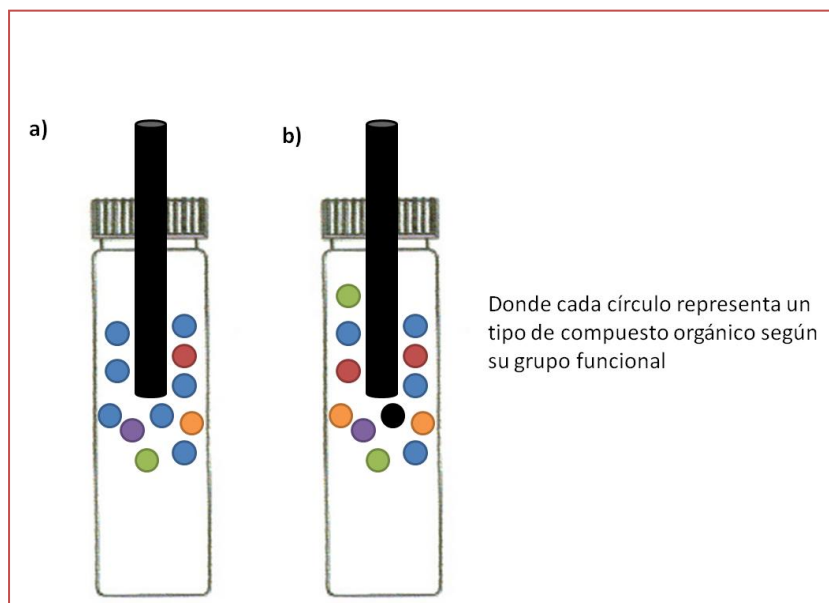


Figura 71. Efecto de competitividad entre analitos: a) por concentración elevada de un compuesto; b) por número de compuestos

4.1.4. VOCs procedentes de gases de combustión

Se dispone de estudios sobre el análisis de partículas y de los gases de combustión emitidos por vehículos diesel ⁹⁰, en mayor parte realizados con el vehículo estacionado y sin identificar los volátiles individuales, sino los gases totales; por ejemplo, el porcentaje de hidrocarburos totales, óxidos de nitrógeno, monóxidos de carbono, etc.

En este estudio se identifican los compuestos volátiles emitidos por los tubos de combustión con el vehículo en funcionamiento. Para tal fin, se retienen los VOCs en las fibras colocadas en el interior del tubo de combustión cuando el vehículo está en movimiento. De esta forma es posible estudiar los VOCs emitidos teniendo en cuenta el efecto que producen las corrientes de aire que circulan en los alrededores del tubo de combustión, que producen un enfriamiento del tubo de combustión y podrían ser un factor que influya sobre el tipo de VOCs. Estas corrientes no existen cuando el vehículo se acelera estacionado.

4.1.4.1. Selección de fibra de SPME

Para la retención de los VOCs se seleccionó la fibra azul clara por ser la fase estacionaria estable a mayor temperatura y por ser la fibra más universal¹ en cuanto al tipo de VOCs retenidos, ya que establece interacciones de dispersión.

4.1.4.2. Selección de la distancia recorrida

Se realizaron dos experimentos utilizando el vehículo V4 y la fibra azul clara. En el primer experimento se recorrieron 7 Km aproximadamente y en el segundo 35 Km. En la figura 72 se presentan los cromatogramas obtenidos en ambos análisis.

¹ Según los resultados obtenidos en los análisis del polen y por la experiencia adquirida en el laboratorio

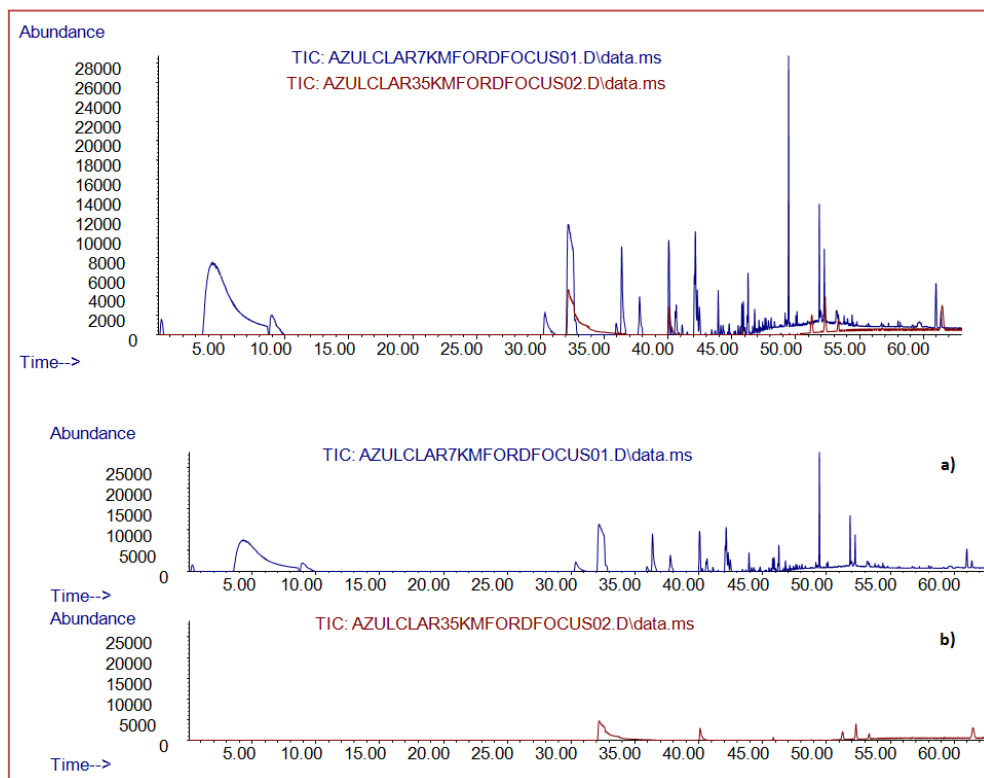


Figura 72. Cromatograma TIC del análisis de VOCs procedentes del vehículo V4 extraídos con fibra azul clara: a) recorrido 7 kM; b) recorrido de 35 Km.

Atendiendo al número de compuestos detectados, puede observarse directamente en el cromatograma que a mayor distancia recorrida, menor número de compuestos detectados. Este hecho puede deberse a que cuando se recorren 35 Km, la fibra está sometida a temperaturas y tiempos superiores que cuando se recorren 7 Km. Este hecho podría atribuirse a una desorción de los VOCs retenidos en la fibra en el interior del tubo de combustión.

Para igualar condiciones de extracción entre vehículos se establece el mismo recorrido realizado a la misma hora del día.

4.1.4.3. Identificación de VOCs de los gases de combustión

Se analizaron los gases de combustión emitidos por los vehículos descritos en la tabla 12 con la fibra azul clara, recorriendo en todos los casos 2 Km aproximadamente.

En las tablas 22-25 se especifican los VOCs identificados y en las figuras 73-76 los cromatogramas obtenidos.

Tabla 22. Identificación de VOCs procedente del vehículo V1 (WPolo de gasolina)

Vehículo V1				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
1	21,1	0,960	Benzene	000071-43-2
2	30,3	6,070	Toluene	000108-88-3
3	32,1	5,640	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	000541-05-9
4	35,9	1,570	Ethylbenzene	000100-41-4
5	36,2	1,040	Acetamide	000060-35-5
6	36,4	8,840	Benzene, 1,3-dimethyl-	000108-38-3
7	37,8	2,880	Styrene	000100-42-5
8	40,3	0,460	Benzene, propyl-	000103-65-1
9	40,5	1,510	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	000620-14-4
10	40,7	1,680	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	000611-14-3
11	40,9	0,570	Benzene, 1,3,5-trimethyl-	000108-67-8
12	41,0	0,040	2-Aminophenacetic acid	003342-78-7
13	41,5	0,350	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	000622-96-8
14	42,1	3,940	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	000095-63-6
15	42,2	3,350	Benzaldehyde	000100-52-7
16	42,3	1,060	Benzene, 1,1'-(1-ethenyl-1,3-propanediyl)bis-	061141-97-7
17	42,5	0,590	Benzene, 1-ethenyl-3-methyl-	000100-80-1
18	43,0	0,170	Benzofuran	000271-89-6
19	43,4	0,580	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	000526-73-8
20	43,7	0,920	Benzonitrile	000100-47-0
21	44,1	0,850	Benzene, 1-methyl-3-propyl-	001074-43-7
22	44,3	0,620	Benzene, 1,3-diethyl-	000141-93-5
23	44,8	1,200	Phenol	000108-95-2
24	44,9	0,070	Benzene, 1-methyl-4-propyl-	001074-55-1
25	45,2	0,420	Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	001758-88-9

Vehículo V1				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
26	45,3	0,380	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	000099-87-6
27	45,5	0,940	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	000527-84-4
28	45,8	2,040	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	000541-02-6
29	46,0	0,210	Benzene, 2-ethenyl-1,3-dimethyl-	002039-90-9
30	46,3	2,990	Benzaldehyde, 3-methyl-	000620-23-5
31	46,7	0,730	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-	000095-93-2
32	46,8	2,000	Benzaldehyde, 4-methyl-	000104-87-0
33	46,9	0,490	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	000556-67-2
34	47,0	0,050	Benzene, 1,3-diethyl-5-methyl-	002050-24-0
35	47,1	0,320	Benzene, 2-ethenyl-1,4-dimethyl-	002039-89-6
36	47,4	0,460	1-Phenyl-1-butene	000824-90-8
37	47,4	0,420	Benzonitrile, 4-methyl-	000104-85-8
38	47,7	0,460	Heptane	000142-82-5
39	48,1	0,660	1H-Indene, 1-methyl-	000767-59-9
40	48,4	0,450	2-Methylindene	002177-47-1
41	48,4	0,450	Benzene, (1-methyl-2-cyclopropen-1-yl)-	065051-83-4
42	48,6	0,230	Benzene, (3-methyl-2-butenyl)-	004489-84-3
43	48,7	0,250	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,3-dimethy	004175-53-5
44	48,8	0,850	Benzene, 1,3-dimethyl-5-(1-methylethyl)-	004706-90-5
45	49,1	0,500	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,2-dimethy	017057-82-8
46	49,3	0,610	Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	005779-94-2
47	49,5	4,820	Naphthalene	000091-20-3
48	49,6	0,450	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-	015764-16-6
49	50,1	2,840	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	000540-97-6
50	50,3	0,600	Benzene, (1-methyl-1-butenyl)-	053172-84-2
51	50,5	0,520	Benzaldehyde, 3-ethyl-	034246-54-3
52	50,7	0,660	1H-Indene, 2,3-dihydro-4,7-dimethy	006682-71-9
53	51,0	0,430	Benzene, pentamethyl-	000700-12-9
54	51,1	0,470	1H-Indene, 2,3-dihydro-5,6-dimethy	001075-22-5
55	51,9	2,130	Naphthalene, 2-methyl-	000091-57-6
56	52,3	1,320	Naphthalene, 1-methyl-	000090-12-0
57	53,1	0,060	Hexadecane, 7,9-dimethyl-	021164-95-4
58	53,8	0,220	Naphthalene, 1-ethyl-	001127-76-0
59	53,9	0,060	Naphthalene, 2-ethyl-	000939-27-5
60	54,1	0,190	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	000581-42-0
61	54,4	0,310	Naphthalene, 1,3-dimethyl-	000575-41-7
62	54,5	0,130	Naphthalene, 1,7-dimethyl-	000575-37-1

Vehículo V1				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
63	55,0	0,120	Naphthalene, 1,4-dimethyl-	000571-58-4

Tabla 23. Identificación de VOCs procedente del vehículo V2 (WPolo diesel)

Vehículo V2				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
1	36,2	0,36	Acetamide	000060-35-5
2	36,5	1,21	Hexane, 2,4-dimethyl-	000589-43-5
3	40,1	3,09	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	000556-67-2
4	45,8	1,54	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	000541-02-6
5	46,4	0,44	2-Hexenal	000505-57-7
6	47,7	1,38	Heptane	000142-82-5
7	50,0	1,08	Decane	000629-50-5
8	50,1	3,77	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	000540-97-6
9	51,6	0,48	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	003891-98-3
10	52,0	1,35	Dodecane	000629-59-4
11	53,1	0,64	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	000638-36-8
12	53,3	1,96	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	000107-50-6
13	53,8	1,27	Tridecanol, 2-ethyl-2-methyl-	1000115-66-1
14	55,8	0,50	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl-	054833-48-6

Tabla 24. Identificación de VOCs del vehículo V3 (WPasat-diesel)

Vehículo V3				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
1	21,140	0,40	Benzene	000071-43-2
2	22,805	0,20	Acetic acid	000064-19-7
3	30,340	0,40	Toluene	000108-88-3
4	32,196	3,20	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	000541-05-9
5	35,942	0,12	Ethylbenzene	000100-41-4
6	36,245	0,05	1-Nonene	000124-11-8
7	36,245	0,05	1-Hexene, 3,5-dimethyl-	007423-69-0
8	36,246	0,28	p-Xylene	000106-42-3
9	36,450	0,46	Nonane	000111-84-2
10	36,641	0,09	2-Cyclopenten-1-one	000930-30-3

Vehículo V3				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
11	37,784	0,43	Styrene	000100-42-5
12	40,281	0,15	Benzene, propyl-	000103-65-1
13	40,578	0,28	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	000611-14-3
14	40,676	0,30	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	000622-96-8
15	40,860	0,82	pentane	000109-66-0
16	41,141	1,03	Hexane	000110-54-3
17	41,509	0,14	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	000620-14-4
18	42,080	0,43	Benzene, 1,3,5-trimethyl-	000108-67-8
19	42,158	1,06	Benzaldehyde	000100-52-7
20	42,313	0,25	Benzene, 1,1'-(1-ethenyl-1,3-propanediyl)bis-	061141-97-7
21	42,955	0,24	Benzofuran	000271-89-6
22	43,336	0,16	2,6-Dimethyldecane	013150-81-7
23	43,640	0,12	Undecane, 3,4-dimethyl-	017312-78-6
24	44,141	0,37	Benzene, 1-methyl-3-propyl-	001074-43-7
25	44,818	0,50	Phenol	000108-95-2
26	44,931	0,12	Benzene, 1-methyl-2-propyl-	001074-17-5
27	45,206	0,09	Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl-	000933-98-2
28	45,291	0,15	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	000527-84-4
29	45,820	0,21	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	000541-02-6
30	46,285	0,72	Benzaldehyde, 4-methyl-	000104-87-0
31	46,426	0,38	Tridecanal	010486-19-8
32	46,603	0,16	Undecane, 4-methyl-	002980-69-0
33	46,800	0,34	Benzaldehyde, 2-methyl-	000529-20-4
34	47,132	0,08	Benzene, 2-ethenyl-1,4-dimethyl-	002039-89-6
35	47,887	0,49	Benzene, 1-ethyl-2,4-dimethyl-	000874-41-9
36	47,969	1,35	Dodecane	000112-40-3
37	47,993	0,12	Benzene, (1-methylbutyl)-	002719-52-0
38	48,339	0,60	Phenol, 2-nitro-	000088-75-5
39	48,684	0,05	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,3-dimethyl-	004175-53-5
40	48,825	0,09	Benzene, (1-methyl-1-butenyl)-	053172-84-2
41	49,256	0,45	Benzaldehyde, 4-ethyl-	004748-78-1
42	49,460	1,56	Naphthalene	000091-20-3
43	49,623	0,29	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-2-	003877-19-8
44	50,039	2,17	1-Octadecanesulphonyl chloride	1000342-70-4
45	51,111	0,76	4-Methyl-2H-benzopyrane	021776-94-3
46	51,295	0,60	Eicosane, 10-methyl-	054833-23-7

Vehículo V3				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
47	51,408	0,88	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-5-	002809-64-5
48	51,577	0,64	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	003891-98-3
49	51,746	0,76	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,4-dimethyl-	004175-54-6
50	51,873	0,93	Naphthalene, 1-methyl-	000090-12-0
51	52,374	0,44	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,	004175-54-6
52	52,522	0,59	Naphthalene, 6-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-	022531-20-0
53	52,965	1,15	Naphthalene, 2-methyl-	000091-57-6
54	53,122	1,25	Tridecanol, 2-ethyl-2-methyl-	1000115-66-1
55	53,165	2,14	Tridecane	000629-50-5
56	53,284	0,93	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-5,6-dimethyl-	020027-77-4
57	54,096	1,42	Naphthalene, 1,7-dimethyl-	000575-37-1
58	54,307	0,71	1,4-Dimethyl-2-cyclopentylbenzene	062379-92-4
59	54,434	0,73	Naphthalene, 1,3-dimethyl-	000575-41-7
60	54,533	0,78	Naphthalene, 1,6-dimethyl-	000575-43-9
61	55,806	3,96	Tetradecane	000629-59-4
62	55,810	2,80	pentadecane	000544-76-3
63	55,998	0,17	Hexadecane	000544-76-3
64	57,383	0,59	Azulene, 4,6,8-trimethyl-	000941-81-1
65	58,152	2,31	Heptadecane	000629-78-7
66	58,322	1,70	Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl	001921-70-6
67	61,024	1,41	10-Methylnonadecane	056862-62-5
68	61,419	0,88	Eicosane	000112-95-8

Tabla 25. Identificación de VOCs del vehículo V4 (FFocus-gasolina)

Vehículo V4				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
1	32,224	12,67	cyclotrisiloxane, hexamethyl-	000541-05-9
2	36,408	2,87	p-Xylene	000106-42-3
3	37,805	1,27	Styrene	000100-42-5
4	40,606	0,33	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	000620-14-4
5	40,684	0,55	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	000622-96-8
6	42,179	2,82	Benzaldehyde	000100-52-7
7	42,335	0,78	Benzene, 1,1'-(1-ethenyl-1,3-propanediyl)bis-	061141-97-7

Vehículo V4				
Nº	t _R , minutos	Área, %	Compuesto	CAS Nº
8	45,820	0,44	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	000541-02-6
9	45,933	0,47	9,10-(1,2-Benzeno)anthracene, 2,3-dimethyl-9,10-dihydro-	027884-45-3
10	49,475	2,95	Naphthalene	000091-20-3
11	51,887	1,37	Naphthalene, 2-methyl-	000091-57-6
12	52,276	1,46	Naphthalene, 1-methyl-	000090-12-0

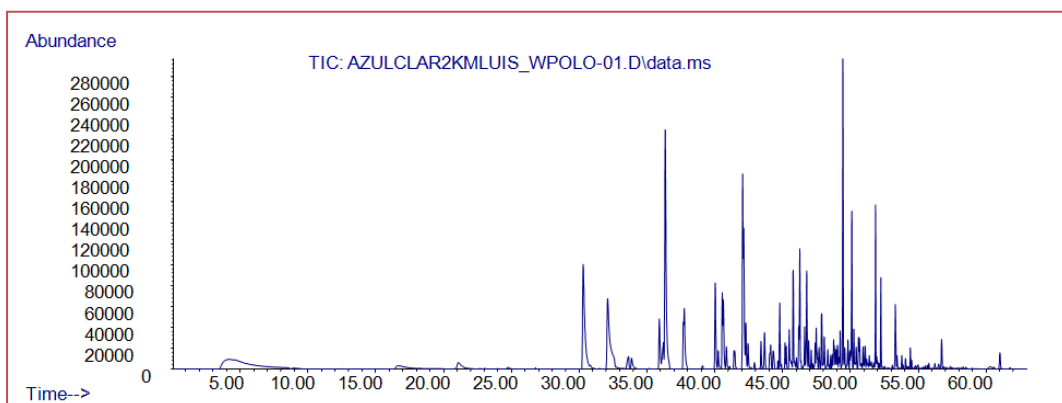


Figura 73. Cromatograma TIC del vehículo V1 (WPolo gasolina).

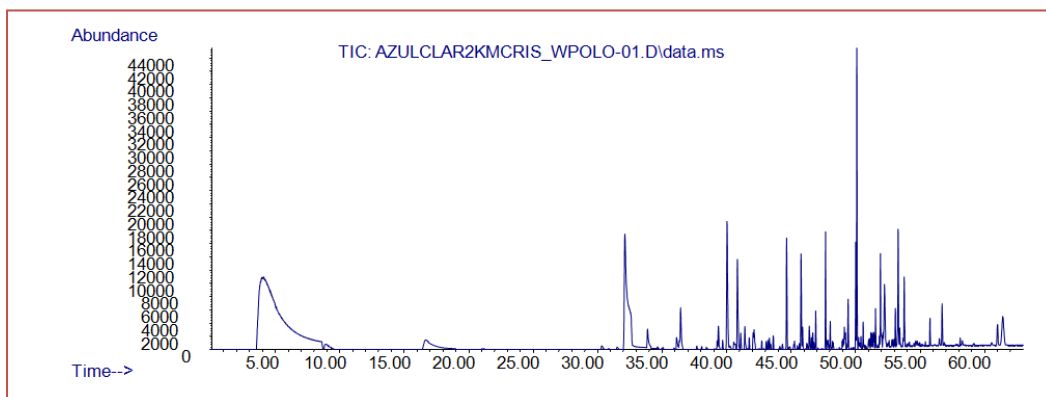


Figura 74. Cromatograma TIC del vehículo V2 (WPolo diesel).

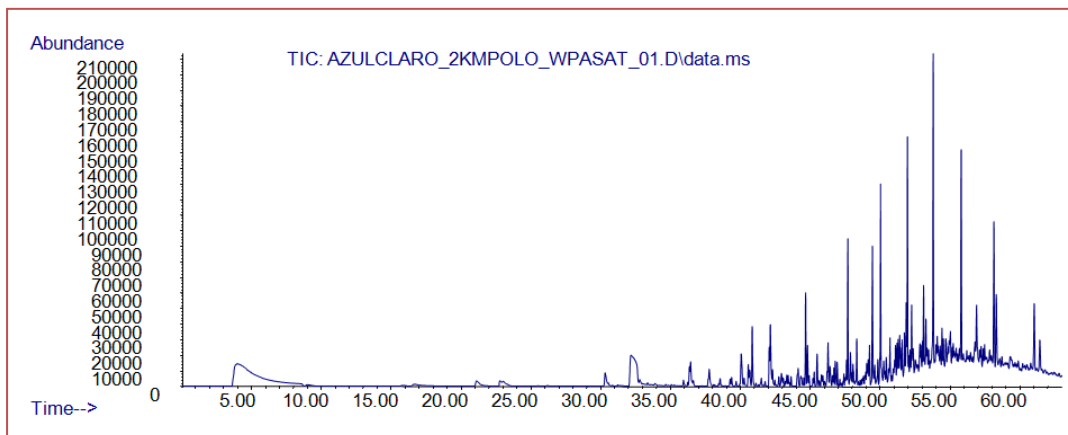


Figura 75. Cromatograma TIC del vehículo V3 (WPasat diesel).

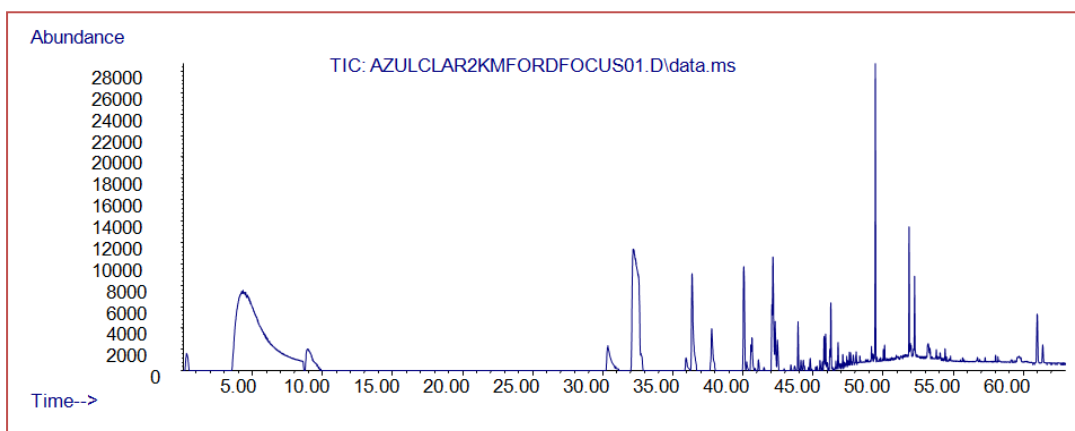


Figura 76. Cromatograma TIC del vehículo V4 (FFocus gasolina).

A partir de los resultados obtenidos y clasificando cada VOCs según su grupo funcional principal, aplicando la misma clasificación especificada en el apartado 4, se elaboran las figuras 77-80.

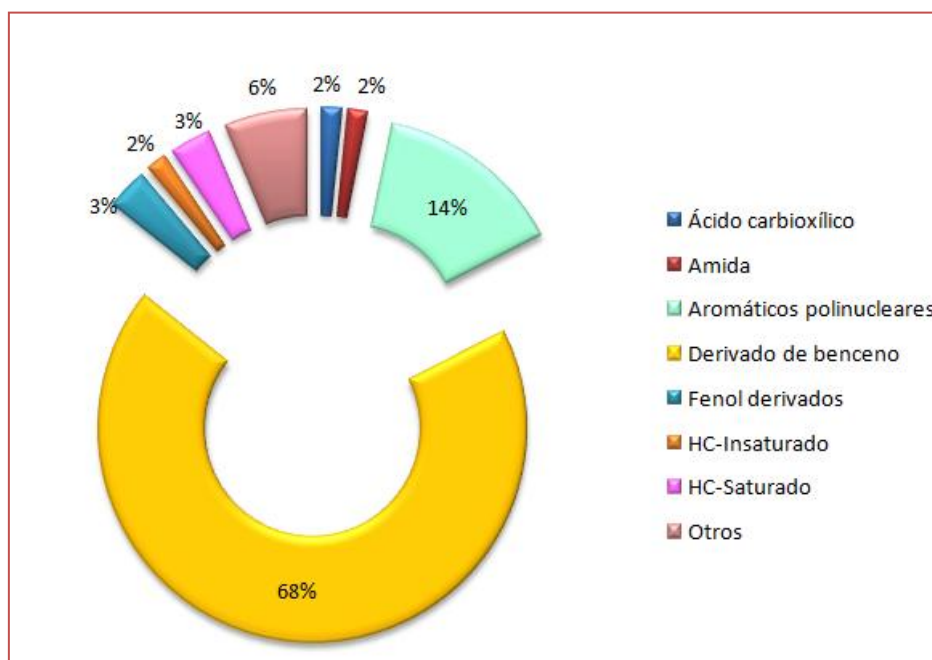


Figura 77. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V1 (WPolo-gasolina)

En el vehículo V1, Se han identificado 63 VOCs; la mayoría de los cuales son derivados del benceno (68%), entre los que se encuentran los BTEX, compuestos característicos en el combustible de gasolina. Cabe resaltar la presencia de derivados de 1H-Indene, ya que derivados de este compuesto han sido detectados en algunos de los pólenes. Por otra parte, se detecta la presencia de benceno en los gases de combustión de este vehículo. Este compuesto es conocido por su elevada toxicidad y su relación directa con enfermedades como el cáncer; bien es cierto que este vehículo posee una antigüedad de más de 14 años y en esa época no existían normativas de expulsión de gases tan exigente como las actuales. Otro grupo importante identificado es el de compuestos aromáticos polinucleares con un 14%; en este grupo se ha identificado el naftaleno y derivados. Por último, el grupo asignado como “Otros”, con un 6% del total, corresponde a silanos procedentes de la descomposición de las fases estacionarias de la columna y/o la fibra.

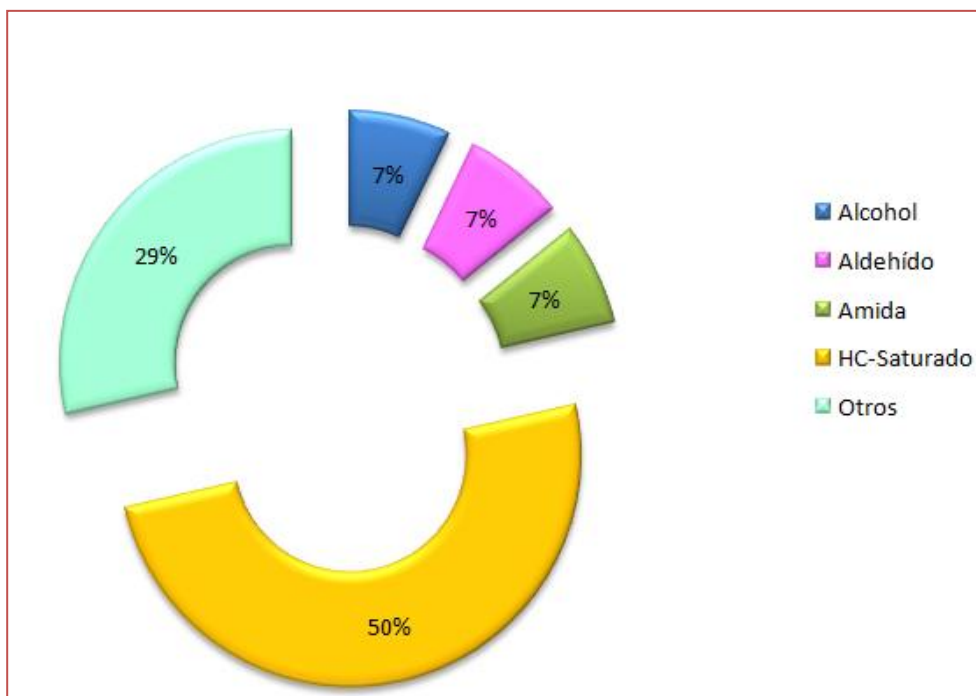


Figura 78. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V2 (WPolo-diesel)

En el vehículo V2, se han identificado 14 VOCs; el 50% de los cuales corresponde al grupo de hidrocarburos saturados con cadenas que contienen entre 6 a 17 carbonos y el 57% son de estructura ramificada. El grupo de "Otros" con un 29%, corresponde como en el caso anterior a silanos y derivados. El bajo número de compuestos detectados puede atribuirse al moderno sistema de salidad de gases que contiene un filtro de partículas. Dicho filtro, también conocido como FAP o DPF por sus siglas en inglés o francés respectivamente, es un sistema destiando a reducir la emisión de gases contaminantes procedentes de vehículos diesel reteniendo partículas sólidad geneardas en este tipo de motores.

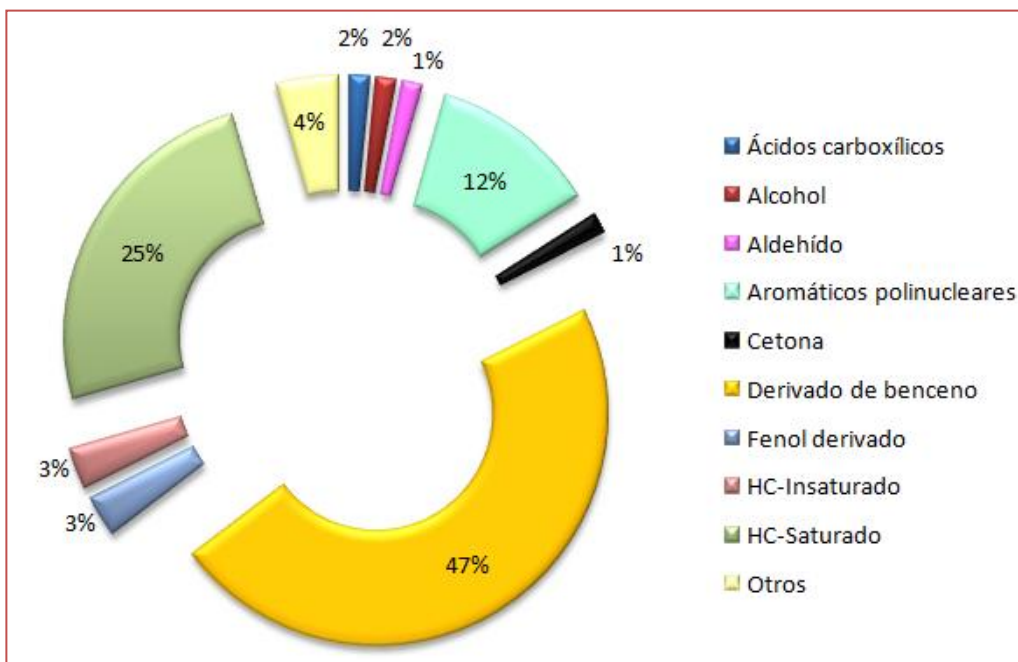


Figura 79. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V3 (WPasat-diesel)

En el vehículo V3 es en el que más VOCs se han identificado, con un total de 68. En este caso, no existe un grupo claramente mayoritario sino tres; un 47% del total son el benceno y derivados, entre los que se encuentran el propio benceno, el benzofurano y los BTEX; La presencia de BTEX en un combustible diesel parece indicar que el combustible utilizado no es puro. El 25% de los compuestos identificados son hidrocarburos saturados con cadenas de carbonos comprendidas entre 5 y 20 y con diferente grado de ramificación. El tercer grupo principal son los compuestos aromáticos polinucleares (12%), entre lo que se encuentra el naftaleno y derivados, derivados del benzopireno y un derivado del azuleno.

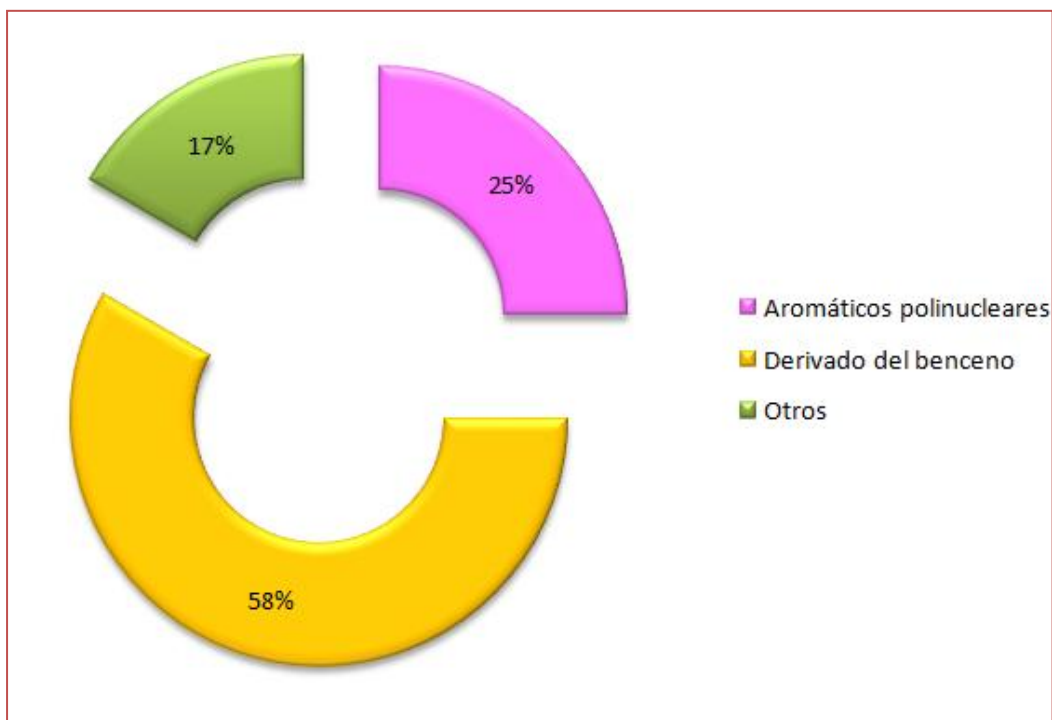


Figura 80. Porcentaje de VOCs según su grupo funcional del vehículo V4

Respecto al vehículo V4, se han identificado 12 compuestos en total. El grupo principal lo constituyen los derivados del benceno con un 58%; entre los que se encuentran los BTEX y compuestos con el anillo bencénico polisustituido. El 25% son compuestos aromáticos polinucleares los cuales son derivados del naftaleno y antraceno. Como en los casos anteriores, el grupo de “Otros” lo forman los compuestos procedentes de la descomposición de las fases estacionarias de la fibra y/o columna.

Con objeto de comparar los vehículos que utilizan un combustible similar, se elaboran las gráficas 81a)-81b). En el caso de los vehículos de combustible diesel se observa como el vehículo V2 (matriculación del 2010) produce menos de la mitad de hidrocarburos saturados y no se detecta ningún compuesto aromático polinuclear al compararlo con V3 (matriculación del 2000). Esto puede atribuirse a la mejora tecnológica en la combustión, los nuevos filtros obligatorios en los diesel y la mejora en la tecnología automovilística en general, introducidos por las nuevas normativas europeas

de emisiones Euro 5 y Euro 6 **127**, resultando vehículos diesel más respetuosos con el medio ambiente. Cabe destacar que tampoco se detectan ningún derivado del benceno y sí en el V3 (matriculación 2000), pero que puede ser atribuible a purezas del combustible.

Respecto a los vehículos de combustible gasolina, se observa que V1 emite siete veces más de derivados de benceno, incluido al propio benceno, y más del doble de compuestos aromáticos polinucleares.

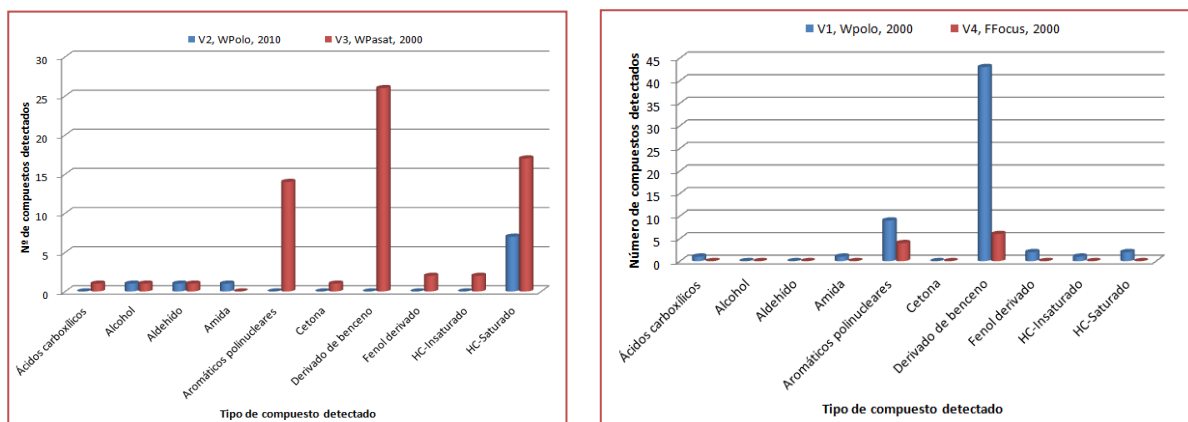


Figura 81. Comparación del tipo de compuestos detectados entre: a) vehículos de diesel; b) vehículos gasolina

Comparando los cuatro vehículos, a pesar de que el vehículo V4 es el que menos VOCs emite, ateniendo a la composición de los compuestos, el vehículo V2 es el más limpio desde el punto de vista medioambiental. No obstante, hay que tener en cuenta que al comparar vehículos diesel con los de gasolina, éstos emiten menos contaminantes que los de diesel, este hecho es bien asumido por las autoridades en Japón, mientras en Europa aumentó el número de matriculación de coches diesel de forma casi exponencial en Japón decrecía hasta casi ser el 0,2% en el año 2008. Las nuevas normativas pretenden conseguir igualar ambos combustibles a nivel de emisiones.

4.2. Análisis mediante microscopía electrónica SEM: morfología y microanálisis

Se presentan las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, SEM, y una breve descripción de su estructura a partir de las mismas, así como los resultados de microanálisis. En las micrografías, la tonalidad de color indica la posible composición del cristal o de la porción de partícula que se está visualizando, es que se denomina como análisis en retrospectiva. Así, un tono brillante y claro indicaría la presencia de partículas de composición mayoritariamente metálicas, como podría ser el acero **128**.

Los análisis de los pólenes se realizaron con los siguientes objetivos:

- Descripción morfológica:
 - Exina del polen sin tratamiento
 - Efecto de la temperatura de 70°C durante una hora, para discernir si la exina se ha modificado durante el proceso de extracción SPME
 - Efecto de un disolvente orgánico (acetona) para comparar posibles modificaciones de la exina con las comentadas en el punto anterior.
- Identificación de partículas inorgánicas exógenas al polen, como son las partículas procedentes del diesel, teniendo en cuenta que la sensibilidad de la técnica empleada está comprendida en el margen (500µm-200nm).
- Microanálisis del polen, identificando los elementos presentes. Para realizar este tipo de análisis se elige una zona donde haya una agrupación de granos de muestra en altura para evitar contaminación con el soporte de la muestra.

Los análisis en partículas procedentes del tubo de combustión se realizaron con los siguientes objetivos:

- Descripción morfológica de la muestra y detección de diferencias entre gasolina y diesel
- Observación cualitativa

4.2.1. Polen

Las imágenes obtenidas y los resultados de microanálisis se presentan en las figuras de 82 a 106, según se describe en la tabla 26. En dicha tabla también se indica el modo de preparación de muestra aplicada a cada polen para la obtención de las micrográficas a diferentes ampliaciones. En la tabla 26 se presenta una tabla resumen de la descripción morfológica observada de los pólenes mediante SEM, basada en la teoría detallada en el apartado de Introducción.

Por lo general, en las imágenes obtenidas no se observa la presencia de partículas exógenas al polen y, en principio, los resultados obtenidos de su composición cualitativa en microanálisis se consideran como habituales en muestras biológicas en todos los pólenes, excepto en el polen Halapense, discutido a continuación.

Cabe destacar que en el caso de Halapense se han detectado la presencia de partículas exógenas de dos tipos: unas imperfecciones en forma de agujas y otras redondeadas con un tamaño del orden de 8 μm . Para el estudio de estas partículas aparentemente exógenas, se realizó su análisis superficial. En la figura 88 se exponen los resultados del microanálisis en la partícula redondeada detectada, ubicada en la superficie de algunos granos de polen, de tamaño menor a 8 μm . La composición en superficie muestra los elementos de carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, cloro, calcio y potasio. La diferencia con los resultados de la partícula de polen es la presencia de pequeñas proporciones de cloro. Por lo que se refiere a la partícula en forma de aguja, en la figura 89 se exponen los resultados del microanálisis. La composición en superficie muestra los elementos de carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, calcio y potasio, siendo aspecto diferencial la elevada presencia de potasio y fósforo con respecto a las anteriores. Los datos de composición cualitativa de estas partículas no permiten su correlación con ningún tipo de compuesto de los detectados mediante espectrometría de masas, en el apartado 4.1.2.2.3.

En el caso del polen *Populus*, las imágenes obtenidas para discernir la estructura de la exina pueden dar lugar a dos tipos de ornamentación, escábrida o verrugosa. La medida de la altura de estas alteraciones puede aportar datos al respecto; según se ha indicado en la tabla 1 del apartado de

Introducción, en la figura 103 se presenta dicha medida, que al ser menor de 1 μm permite concluir que se trata de una estructura de tipo escábrida.

Tabla 26. Resultados obtenidos en SEM: Morfología y microanálisis

Muestra	Régimen de preparación	Descripción morfológica	Microanálisis	Figuras
Birch	Ambiental	Globular, heteropolar, 25 μm , poli-colpado y superficie psilada a fosulada.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre y potasio.	82, 83
Grass	Ambiental	Navicular, prolado, isopolar, (55x34) μm , di-colpado en polo proximal y superficie de psilada a escábrida.	Carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, azufre y potasio.	84, 85
¹ Halapense	Ambiental y alto vacío	Navicular, isopolar, prolado, (38x28) μm , di-colpado en polo proximal y superficie de psilada a escábrida.	Carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, azufre y potasio.	86, 87, 88, 89
Olmo	Ambiental	Navicular, prolado, heteropolar, (33x27) μm , poli-colpado en polo proximal y superficie psilada.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre y potasio.	90, 91
Plátano	Ambiental	Navicular, prolado, isopolar, (22x15) μm , di-colpado en el polo proximal y superficie reticular.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre , potasio y posiblemente sodio en trazas.	92, 93
Poa	Ambiental	Navicular, prolado, heteropolar, (32x23) μm , poli-colpado en el polo proximal, presencia de pseudoaperturas en forma de poros y superficie reticular.	Carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, azufre, cloro y potasio.	94, 95
Quercus	Ambiental	Navicular, prolados, isopolares, (38x21) μm , di-colpado en el polo proximal y superficie psilada.	Carbono, oxígeno, magnesio, fósforo, azufre, cloro y potasio.	96, 97
Fraxnius	Ambiental	Globular, isopolar, 24 μm , tri-colpado en el polo proximal y superficie reticulada.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre y potasio.	98, 99

¹ En este polen se ha detectado la presencia de partículas exógenas que han sido estudiadas en este apartado. En la tabla se presenta la información obtenida sólo de la partícula propia del polen.

Muestra	Régimen de preparación	Descripción morfológica	Microanálisis	Figuras
Olivo	Ambiental y alto vacío	Navicular, prolado, isopolar, (28x18) μm , di-colpado en el polo proximal y superficie reticulada.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre , potasio y posiblemente calcio en trazas.	100, 101
Populus	Ambiental y alto vacío	Globular, heteropolar, 25 μm , di-colpado en el polo proximal y superficie escábrida.	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre , potasio y posiblemente calcio en trazas.	102, 103, 104
Arizónica	Ambiental y alto vacío	Globular, heteropolar, 25 μm , di-colpado y tri-colpado en el polo proximal y superficie lisa con una capa rugosa e irregular	Carbono, oxígeno, fósforo, azufre y potasio.	105, 106

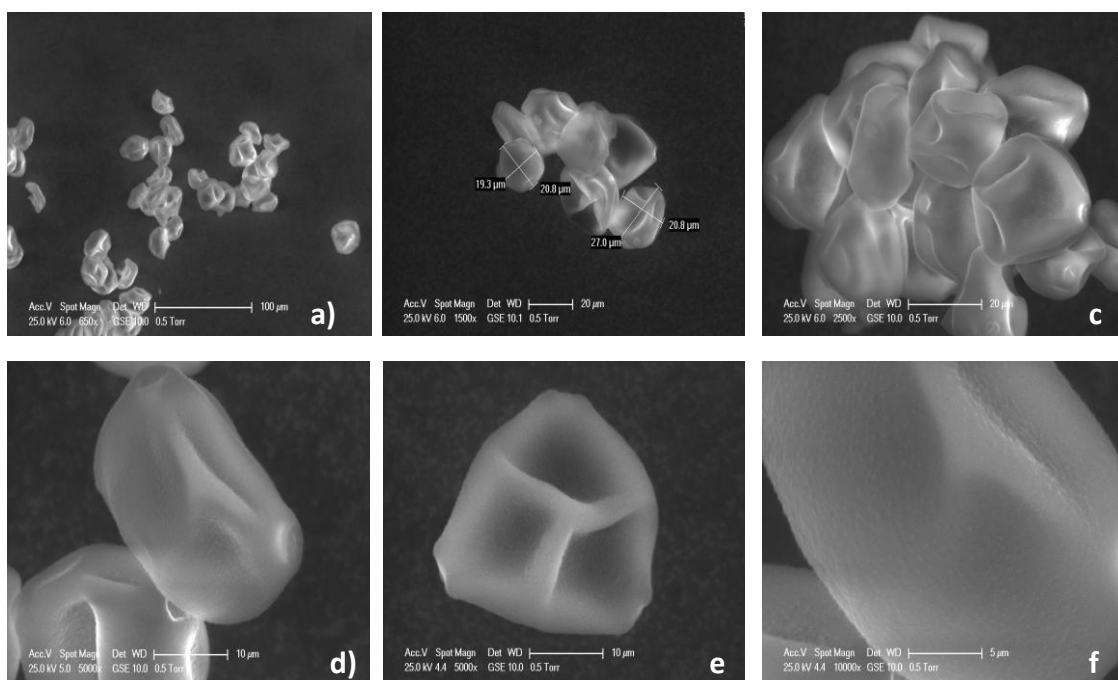


Figura 83. BIRCH; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) y c) escala de 20 µm en distintas zonas; d) y e) escala de 10 µm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 µm con la ornamentación en superficie.

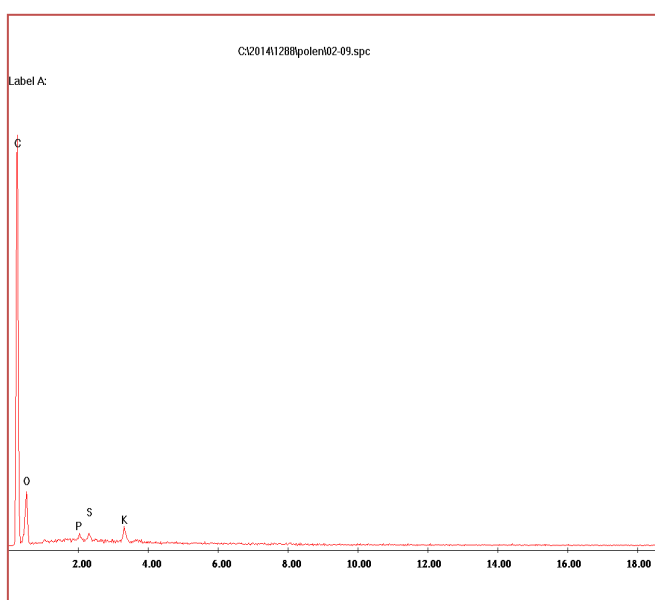


Figura 82. BIRCH; microanálisis

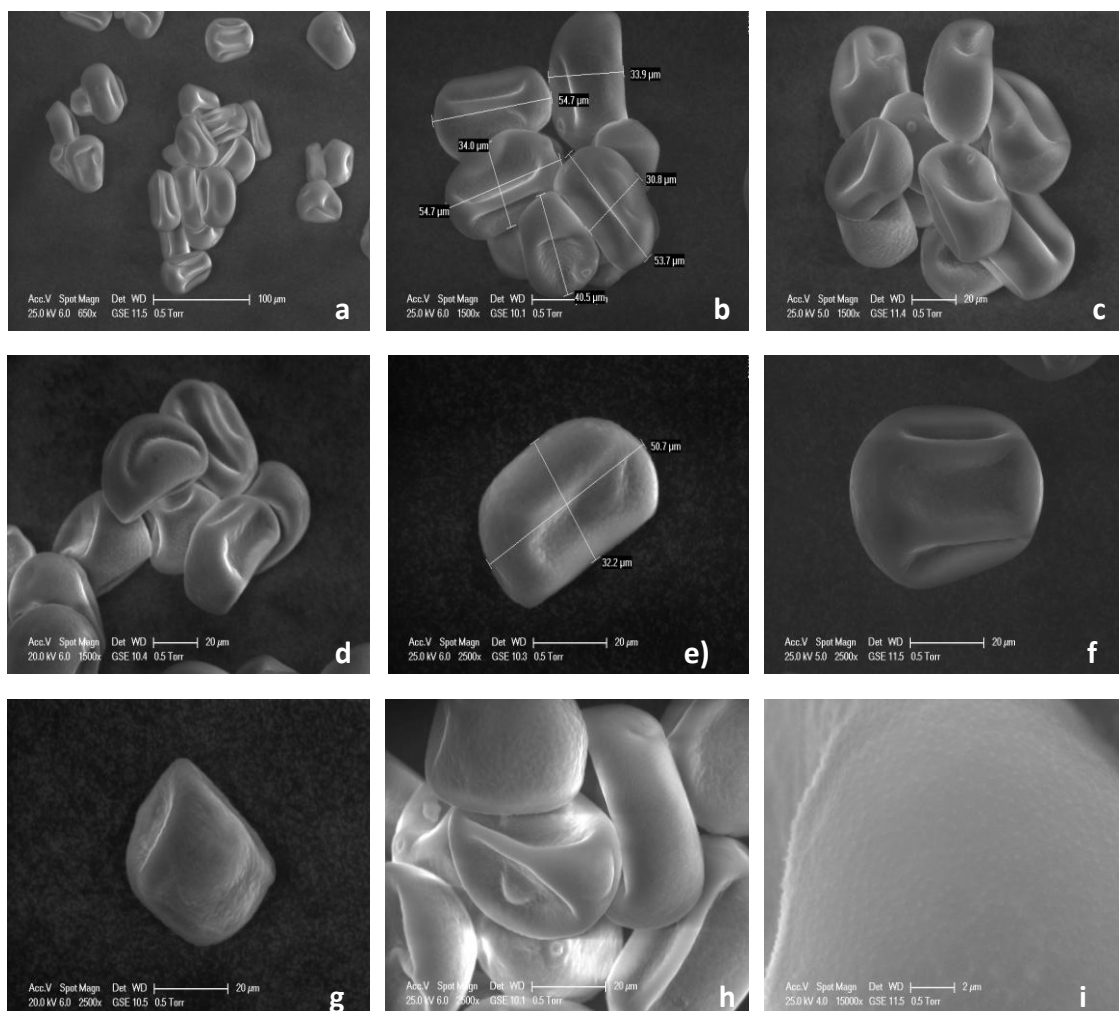


Figura 84. GRASS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) escala de 40,5 µm, donde se identifica las dimensiones de varios granos; c) y d) escala de 20 µm en distintas zonas; e) escala de 20 µm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 2 µm con la ornamentación en superficie.

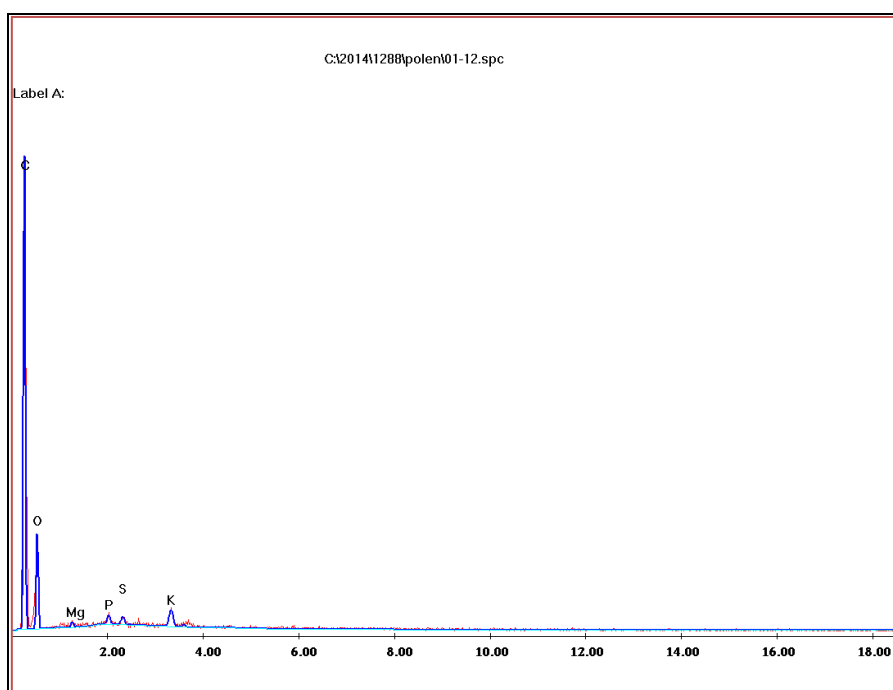


Figura 85. GRASS; microanálisis

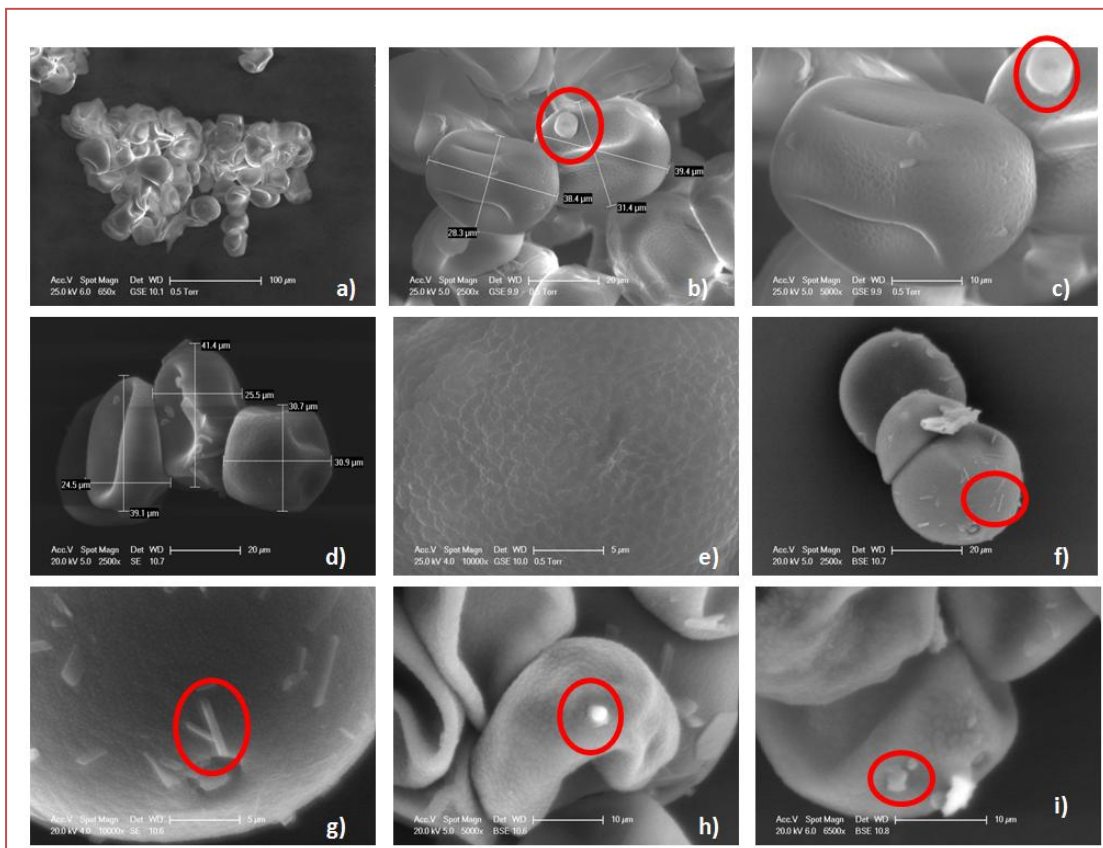


Figura 86. HALAPENSE; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental y alto vacío: a) escala de 100 μm; b), d) y f) escala de 20 μm en distintas zonas; c), h) e i) escala 10 μm en distintas zonas; e) y g) escala de 5 μm en distintas zonas. En rojo se marcan las imperfecciones comentadas.

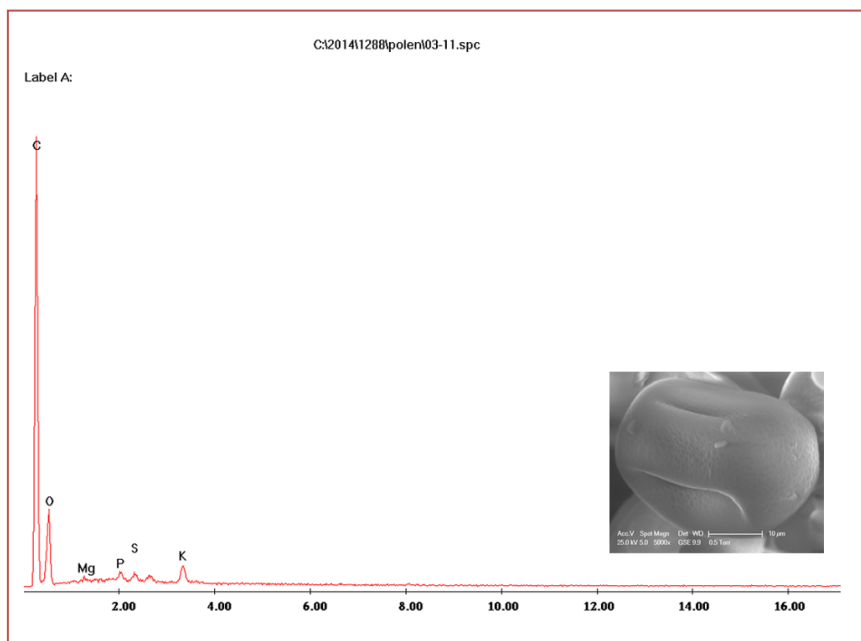


Figura 87. Microanálisis del polen HALAPENSE en la zona del grano sin anomalías (superficie general).

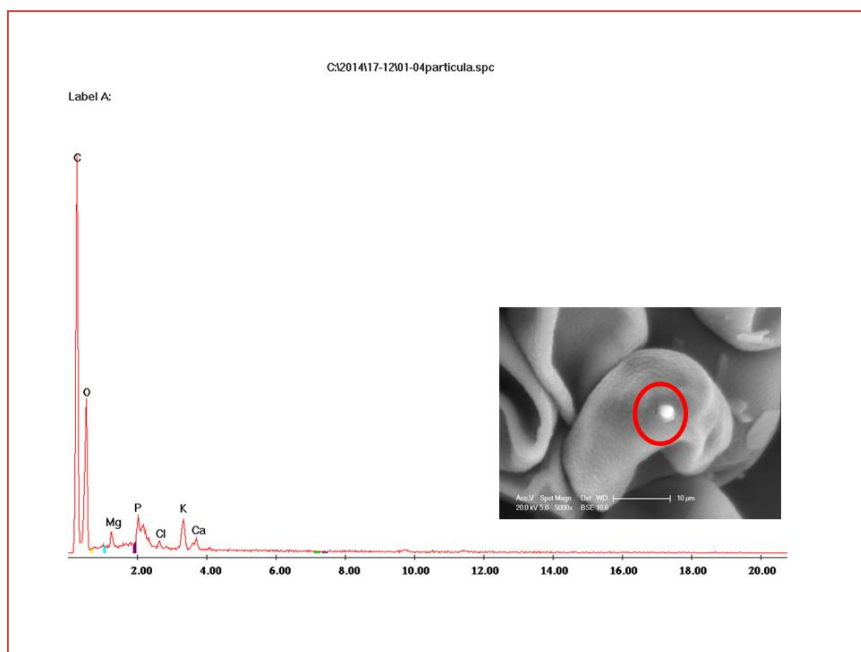


Figura 88. Microanálisis del polen HALAPENSE en las partículas exógena presente en algunos granos.

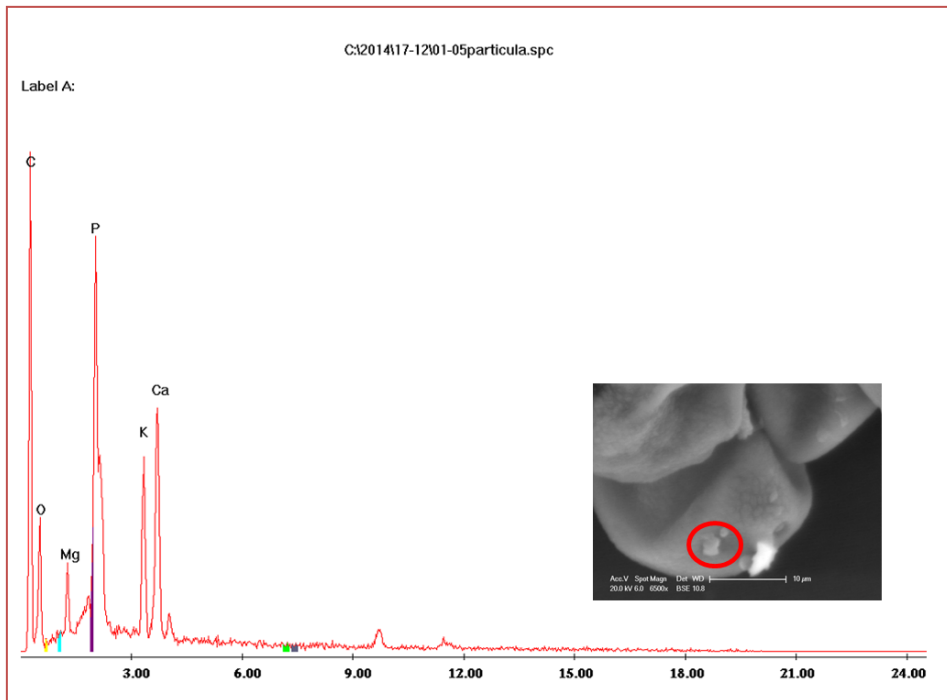


Figura 89. Microanálisis del polen HALAPENSE en una zona anómala.

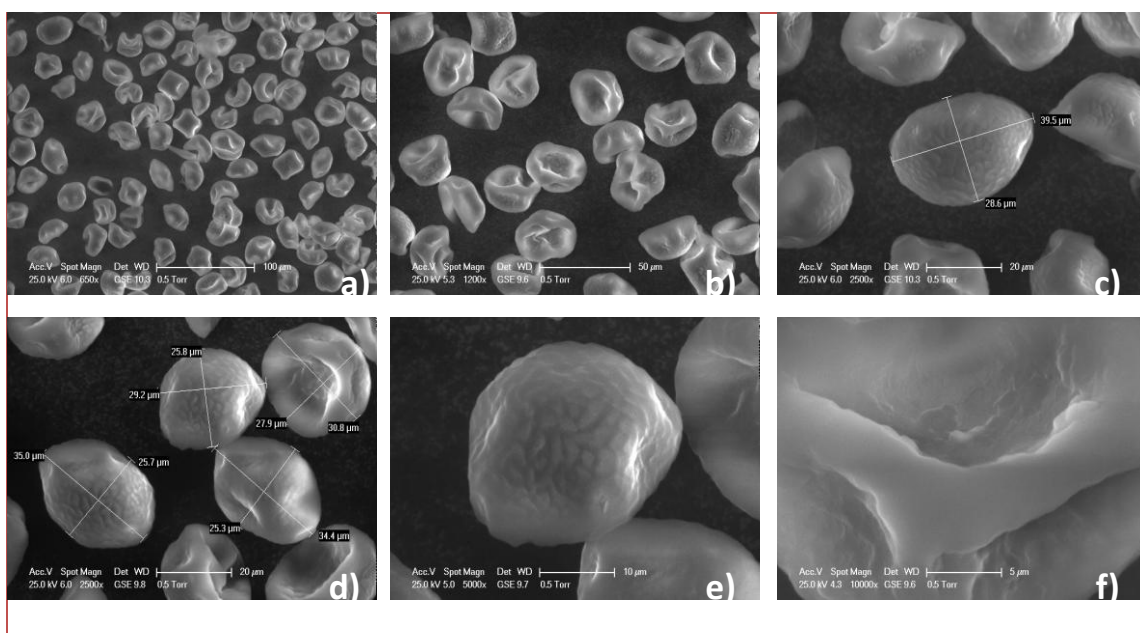


Figura 90. OLMO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) escala de 50 µm; c) y d) escala de 20 µm en distintas zonas; e) escala de 10 µm donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 µm con la ornamentación en superficie.

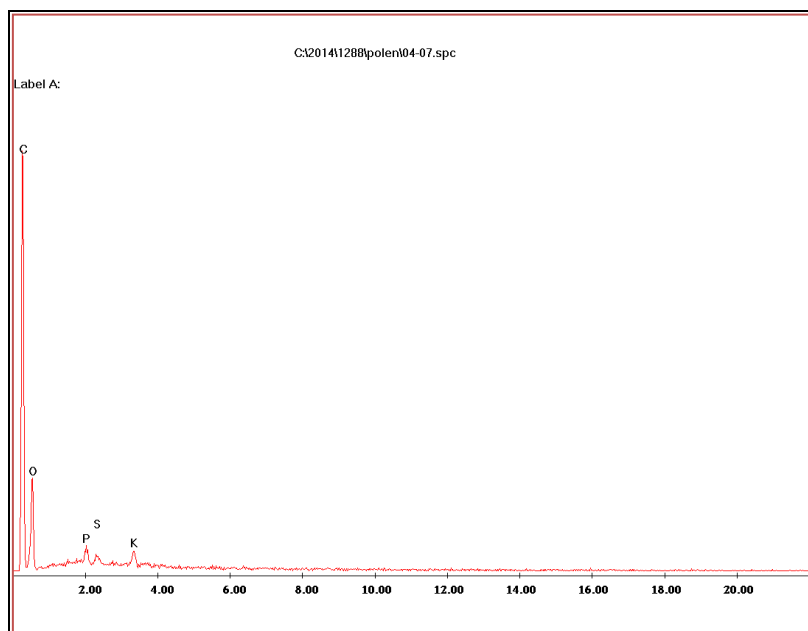


Figura 91. OLMO; microanálisis

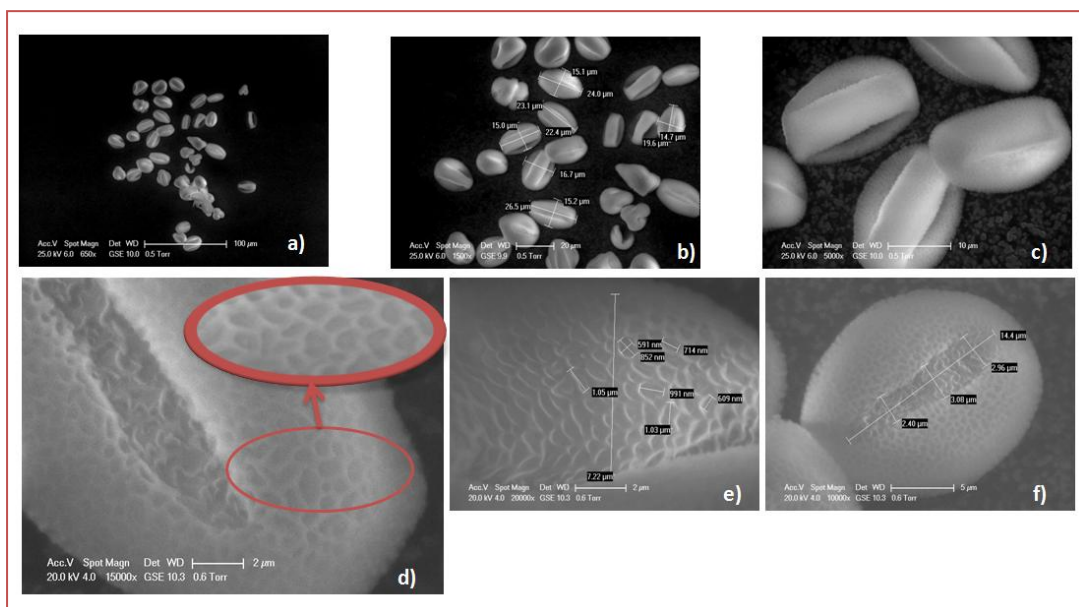


Figura 92. PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) escala de 20 µm; c) escala de 10 µm donde se visualiza un único grano de polen; d) y e) escala de 2 µm donde se visualiza la ornamentación con detalle; f) escala de 5 µm con la ornamentación en superficie.

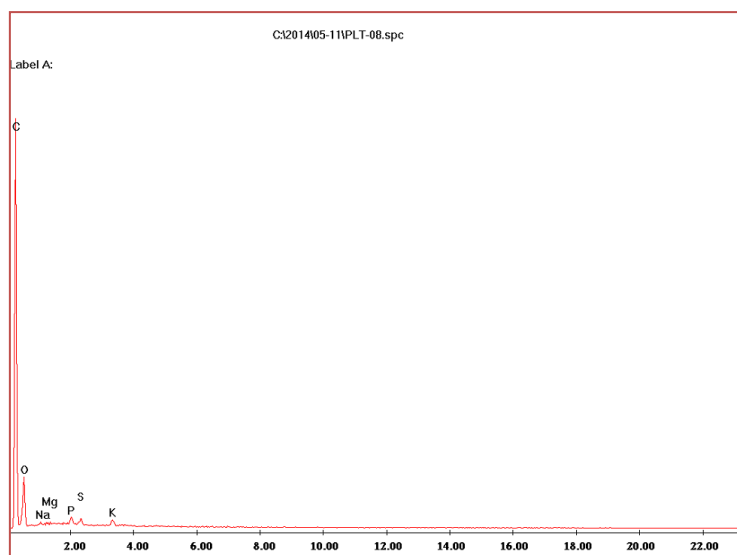


Figura 93. PLÁTANO; microanálisis

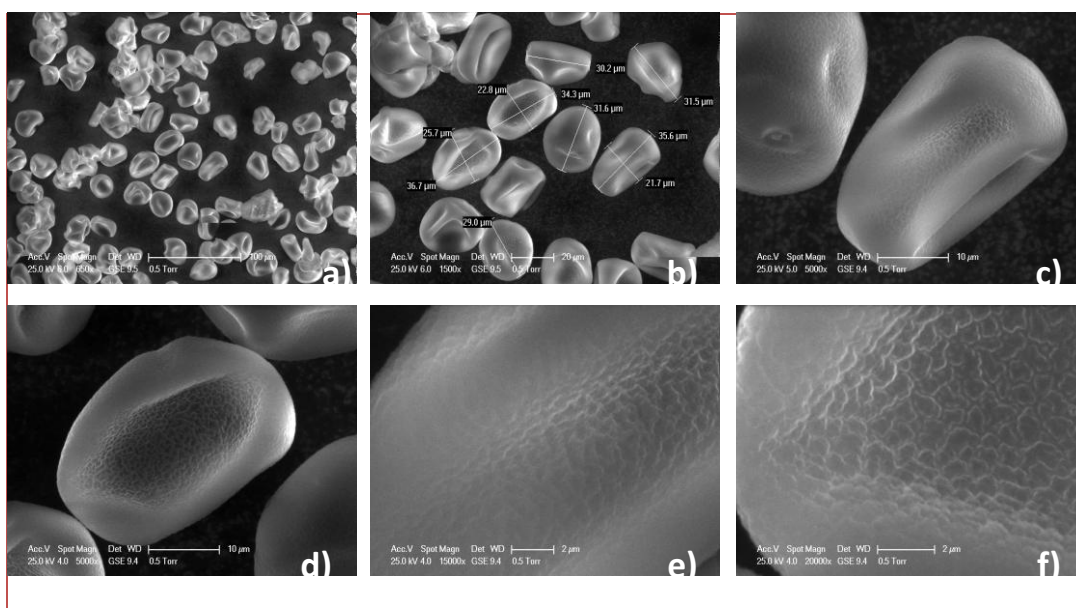


Figura 94. POA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) escala de 20 µm en distintas zonas; c) y d) escala de 10 µm donde se visualiza un único grano de polen; e) y f) escala de 2 µm con la ornamentación en superficie.

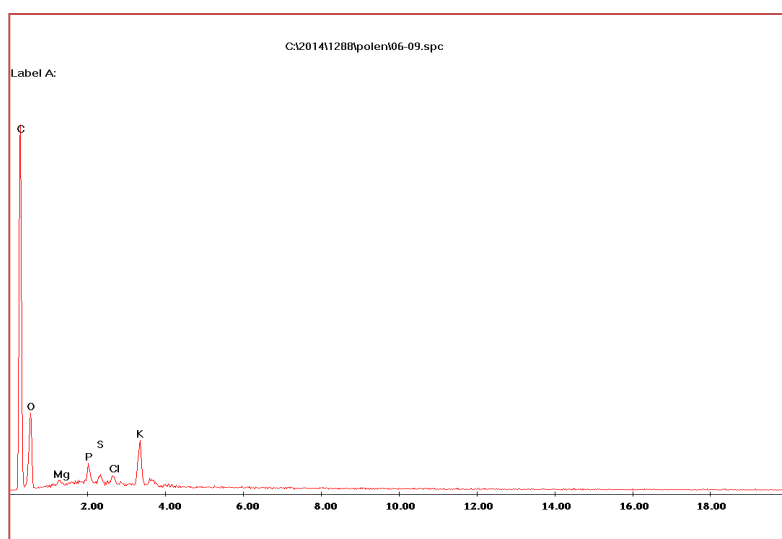


Figura 95. POA; microanálisis.

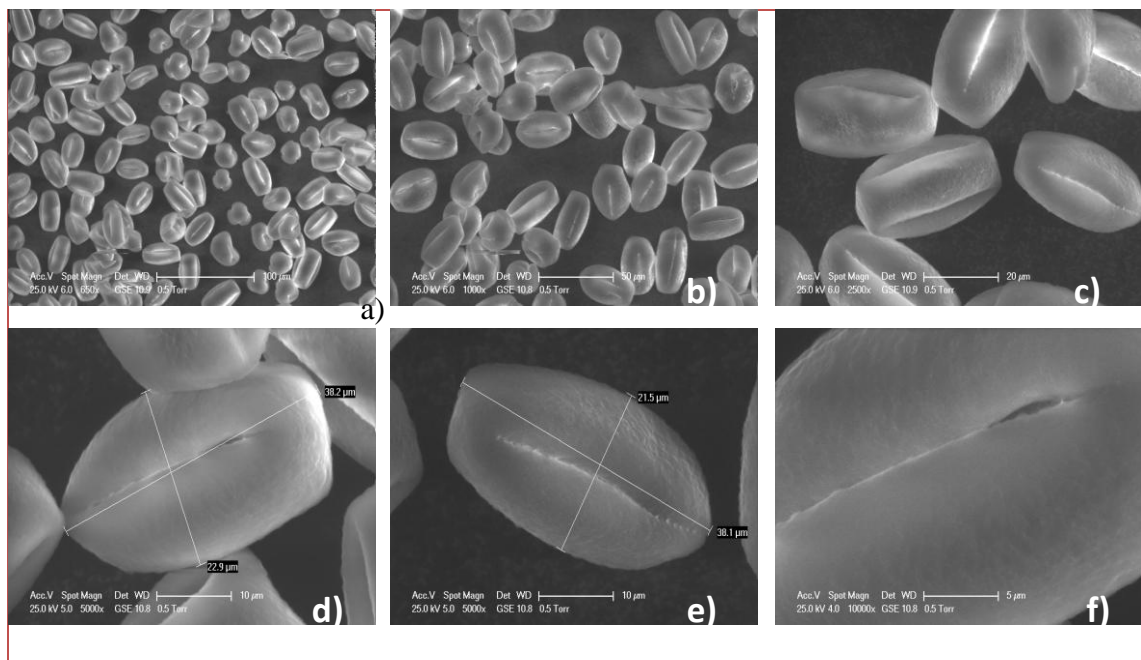


Figura 96. QUERCUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 µm; b) escala de 50 µm; c) escala de 20 µm; d) y e) escala de 10 µm en distintas zonas donde se visualiza un único grano de polen; f) escala de 5 µm con la ornamentación en superficie.

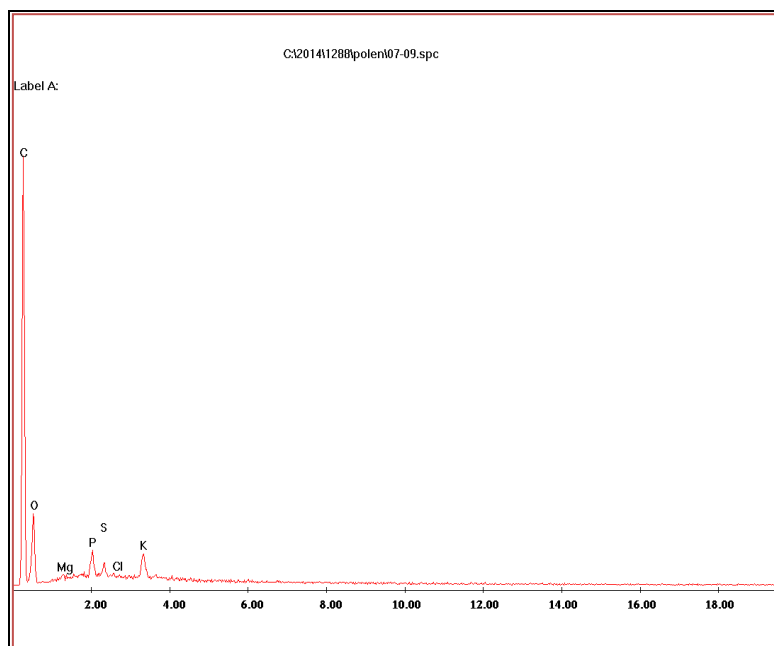


Figura 97. QUERCUS; microanálisis.

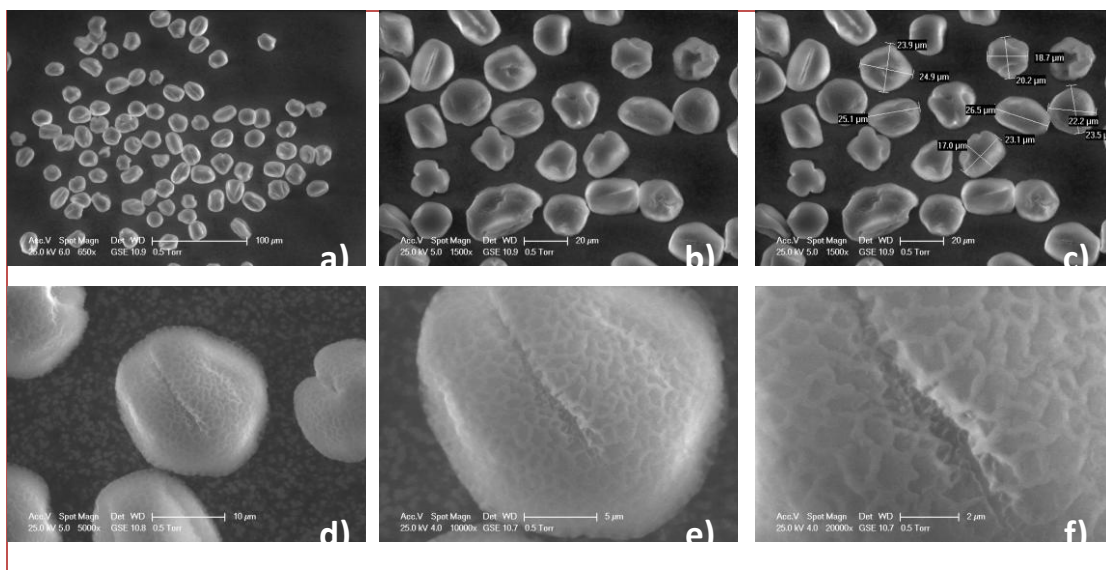


Figura 98. FRAXINIUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental: a) escala de 100 μm ; b) y c) escala de 20 μm en distintas zonas; d) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen; e) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie; f) escala de 2 μm .

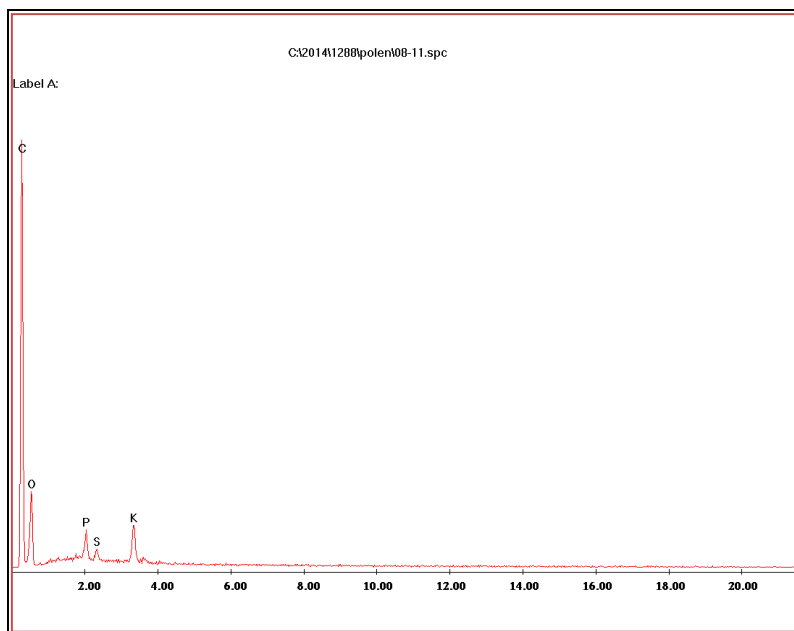


Figura 99. FRAXINIUS; microanálisis.

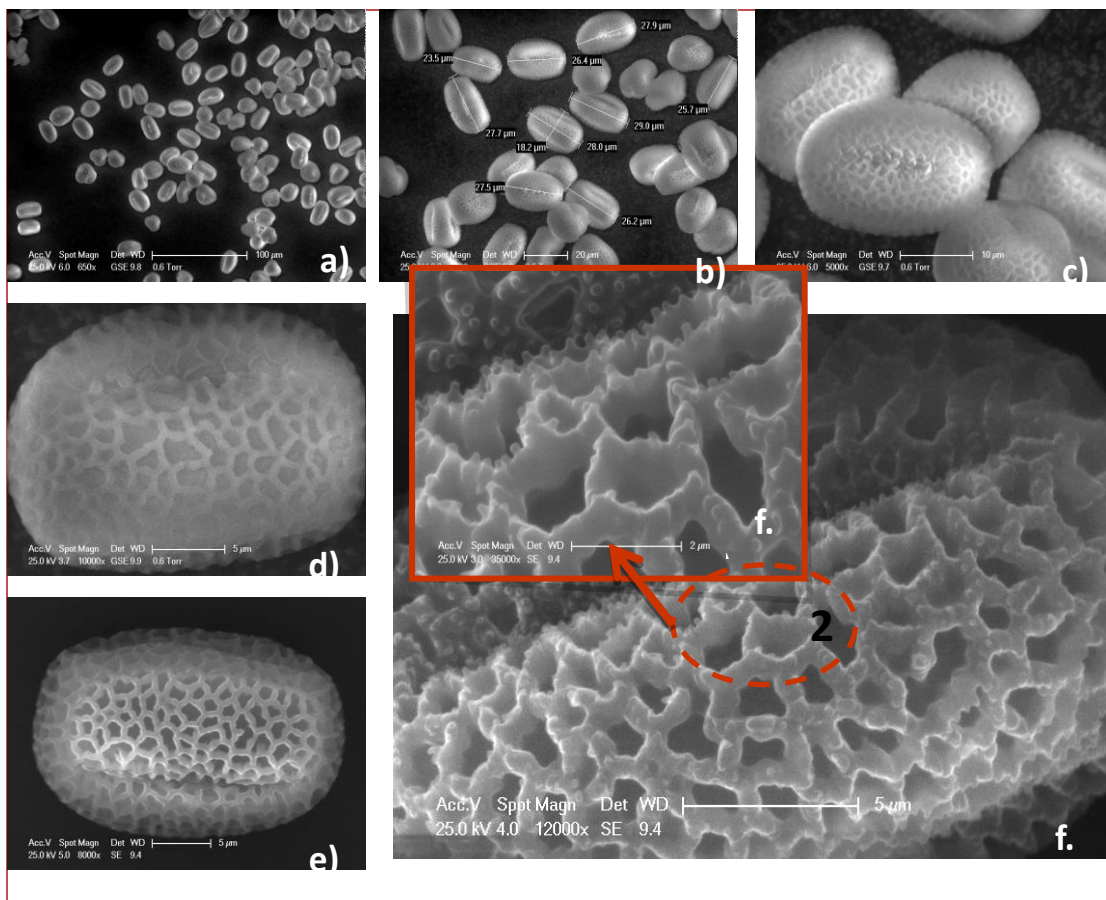


Figura 100. OLIVO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 20 μm (AMB); c) escala de 10 μm donde se visualiza un único grano de polen (AMB); d) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie (AMB); e) y f) escala de 5 μm con más resolución en la imagen (AV).

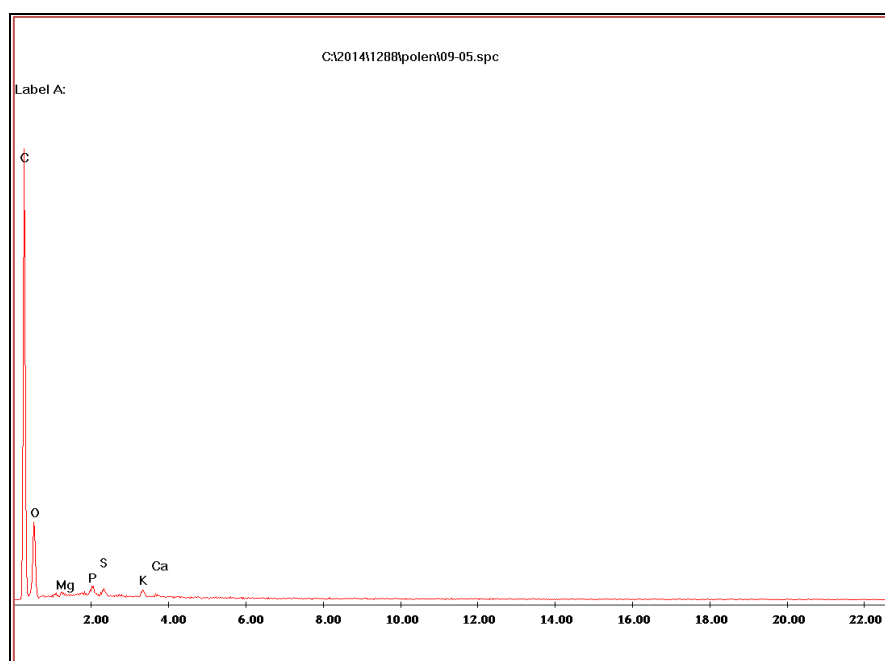


Figura 101. OLIVO; microanálisis.

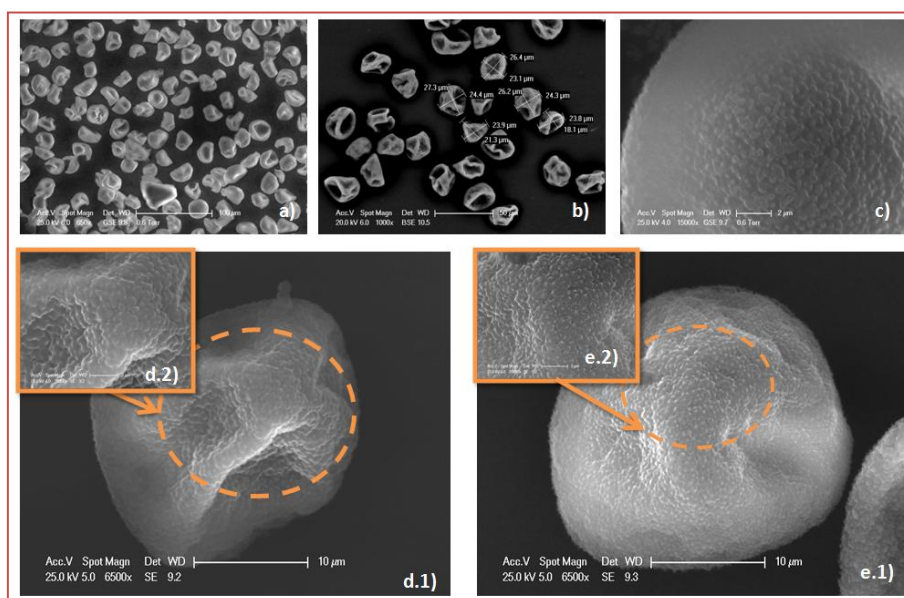


Figura 102. POPULUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 50 μm (AMB); c) escala de 2 μm donde se visualiza la ornamentación (AMB); d) y e) escala de 10 μm con la ornamentación en superficie con mayor nitidez (AV)

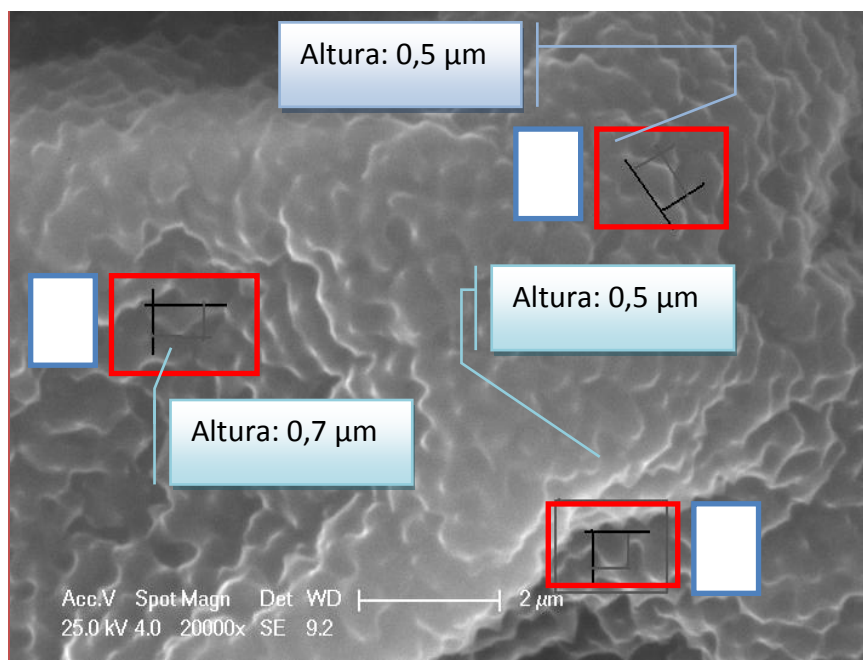


Figura 103 POPULUS; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío, escala de 2 µm con las medidas en altura de la ornamentación.

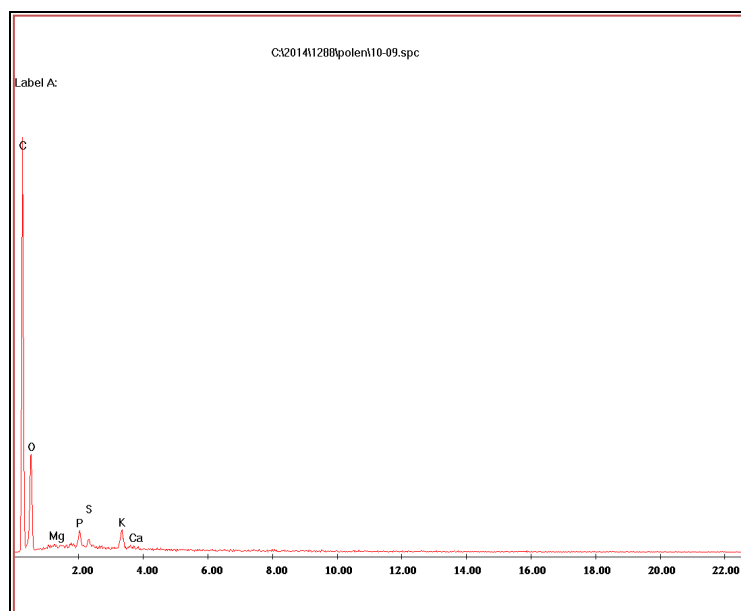


Figura 104 POPULUS; microanálisis.

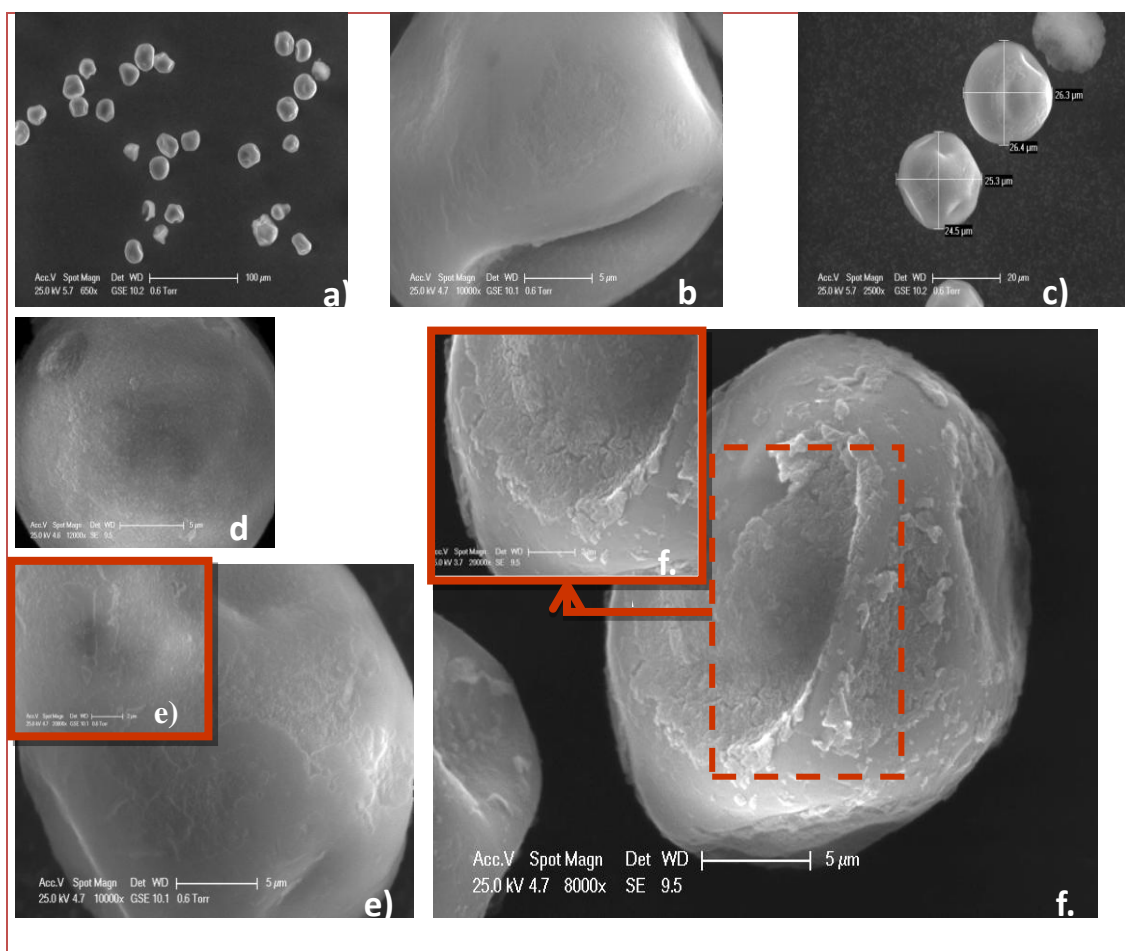


Figura 105. ARIZÓNICA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental (AMB) y alto vacío (AV): a) escala de 100 μm (AMB); b) escala de 5 μm (AMB); c) escala de 20 μm donde se visualiza un único grano de polen (AMB); d) y e) escala de 5 μm con la ornamentación en superficie (AMB); f) escala de 5 μm con más resolución en la imagen (AV).

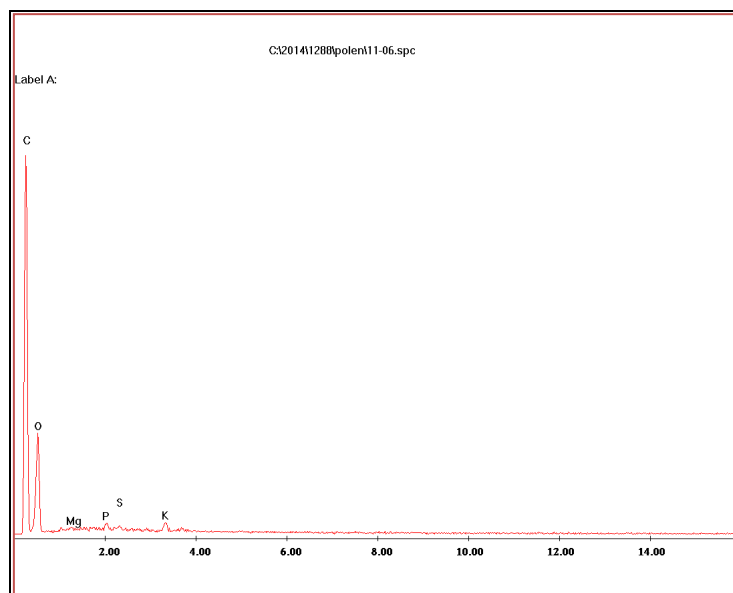


Figura 106. ARIZÓNICA; microanálisis.

4.2.2. Estudio del efecto de la temperatura sobre el polen

Las imágenes obtenidas del análisis en régimen de alto vacío de los pólenes Halapense, Arizónica, Olivo y Plátano se comparan con las obtenidas y descritas en los apartados 107, 108, 109 y 110, respectivamente.

La idea es conocer si la exina del polen pudiera haberse abierto durante el proceso de extracción de VOCs mediante SPME, es decir, comprobar el estado del polen tras someterlo a 70 °C durante una hora.

4.2.2.1. Halapense

En la figura 107 se muestran las imágenes obtenidas a distintos aumentos. Al comparar estas imágenes con las del apartado 4.2.1 se observa que, en la porción de muestra estudiada, no ha sufrido modificaciones de la exina y se siguen detectando las imperfecciones en forma de aguja. En consecuencia, los granos no han sido modificados por la temperatura de 70 °C, durante 1 hora.

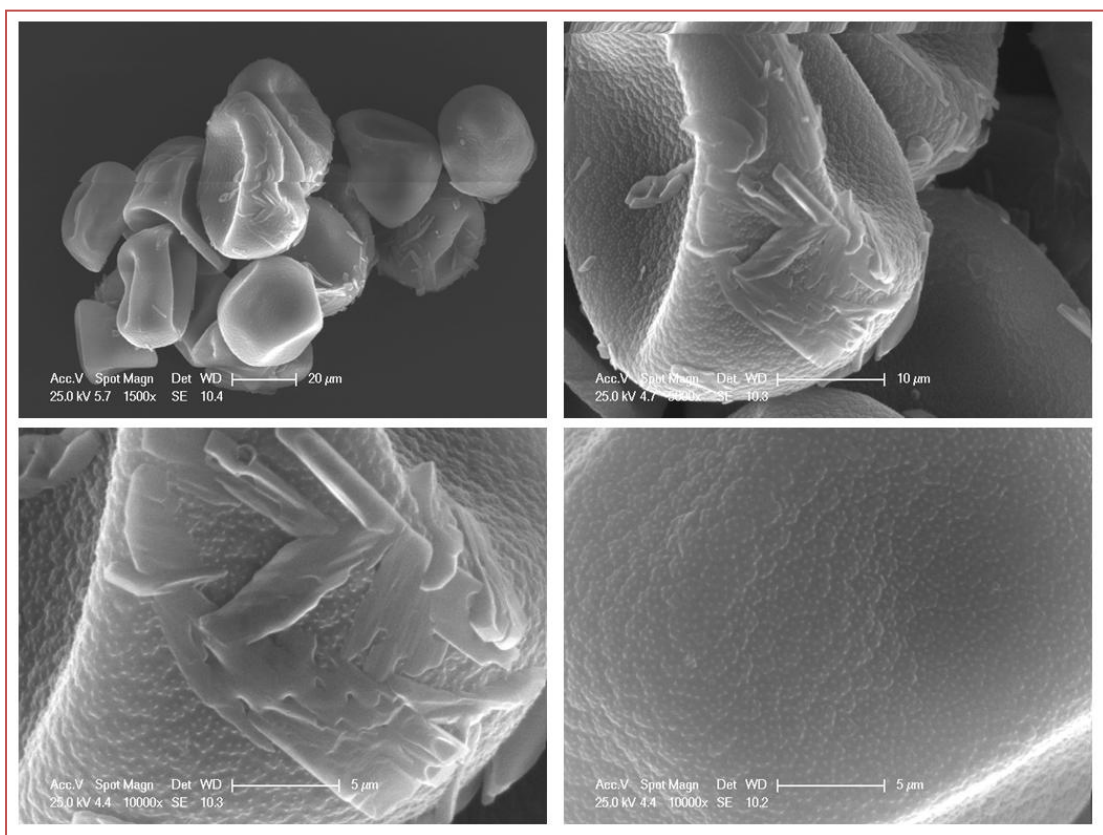


Figura 107. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen HALAPENSE ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío.

4.2.2.2. Plátano

En la figura 108 se muestran las imágenes obtenidas a distintos aumentos. Al comparar estas imágenes con las del apartado 4.2.1 se observa que, en la porción de muestra estudiada, no ha sufrido modificaciones de la exina. En consecuencia, los granos no han sido modificados por la temperatura de 70 °C, durante 1 hora.

Cabe destacar que estas imágenes comparadas con las del apartado 4.2.1, tienen mayor resolución ya que son en régimen de alto vacío y las otras en régimen ambiental; pero aún así se verifica la estructura reticular de la exina sin modificar.

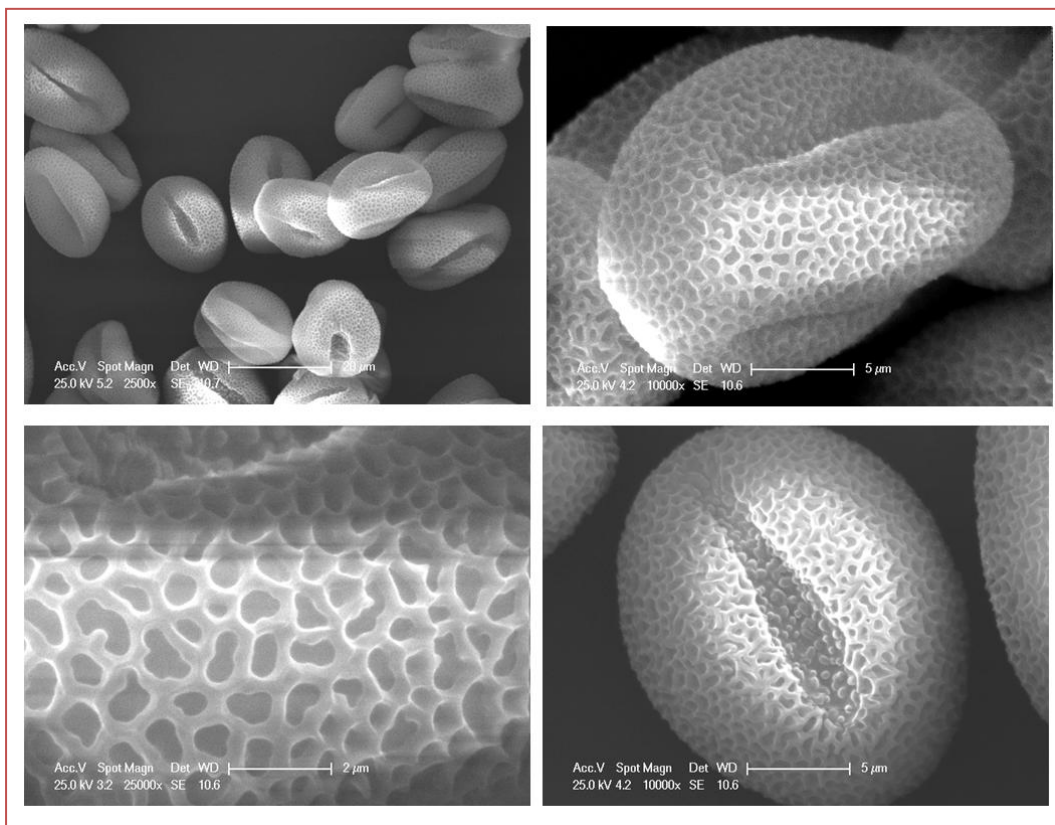


Figura 108. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.2.3. Olivo

En la figura 109 se muestran las imágenes obtenidas a distintos aumentos. Al comparar estas imágenes con las del apartado 4.2.1 se observa que, en la porción de muestra estudiada, no ha sufrido modificaciones de la exina. En consecuencia, los granos no han sido modificados por la temperatura de 70 °C, durante 1 hora.

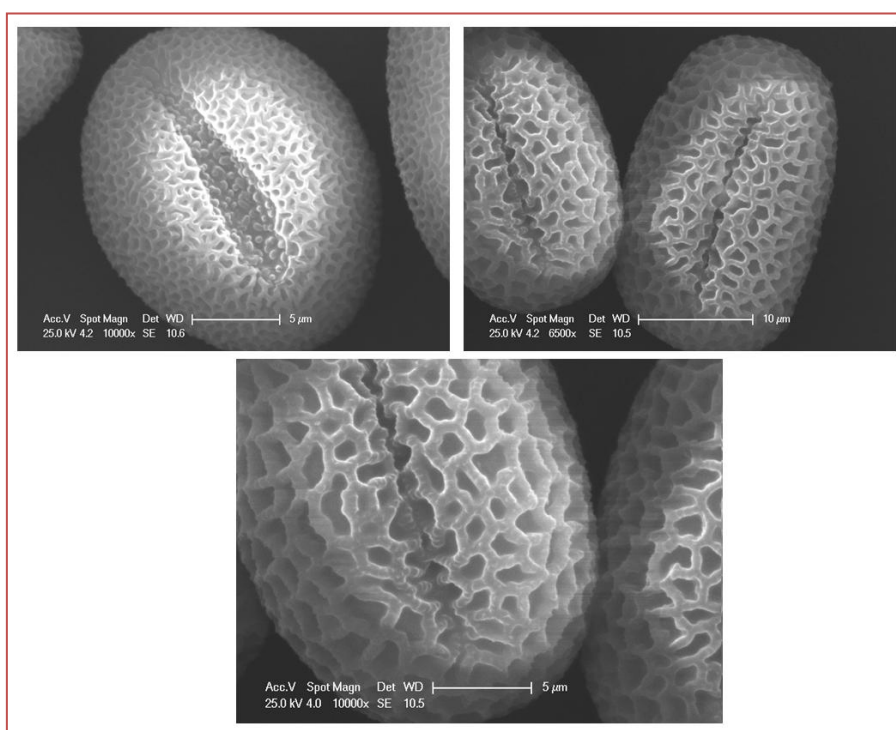


Figura 109. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen OLIVO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.2.4. Arizónica

En la figura 110 se muestran las imágenes obtenidas a distintos aumentos. Al comparar estas imágenes con las del apartado 4.2.1 se observa que, en la porción de muestra estudiada, no ha sufrido modificaciones de la exina. En consecuencia, los granos no han sido modificados por la temperatura de 70 °C, durante 1 hora. Se verifican que la formación de escamas descritas en dicho apartado son acumulaciones verrugosas.

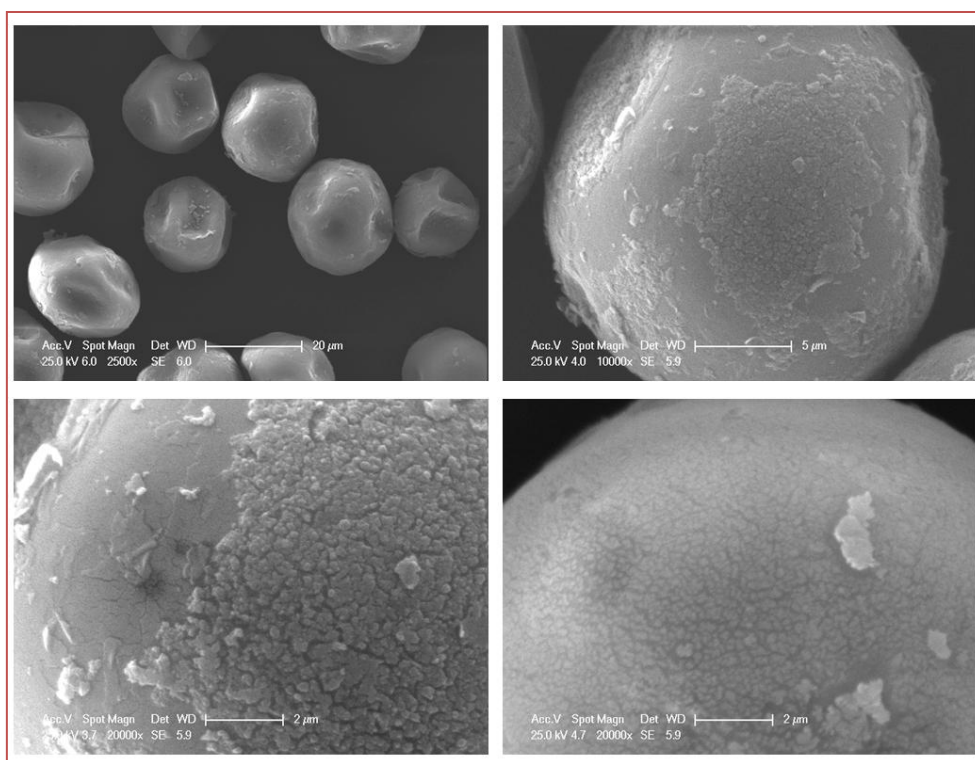


Figura 110. Efecto de la temperatura de 70°C sobre el polen ARIZÓNICA; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.3. Estudio del efecto de un disolvente orgánico sobre el polen

Las imágenes obtenidas del análisis en régimen de alto vacío de los pólenes Halapense, Arizónica, Olivo y Plátano tratados con acetona (figuras 111, 112, 113 y 114) se comparan con las obtenidas sin tratamientos con acetona, descritas en los apartados 4.2.1 y 4.2.2.

La idea es conocer, si procedería, cómo se deforma la exina y poder verificar que en las condiciones anteriores realmente no se ha modificado.

4.2.3.1. Halapense

El grano de polen parece haberse contraído perdiendo parte de su volumen. Además, se observa la aparición de algunos orificios esféricos en la exina, de 2.5 μm aproximadamente. En algunas zonas se observa una desestructuración generalizada y no se observan esas imperfecciones en forma de agujas que podrían haberse disuelto con la acetona.

En consecuencia, se observa el efecto de la acetona en la exina.

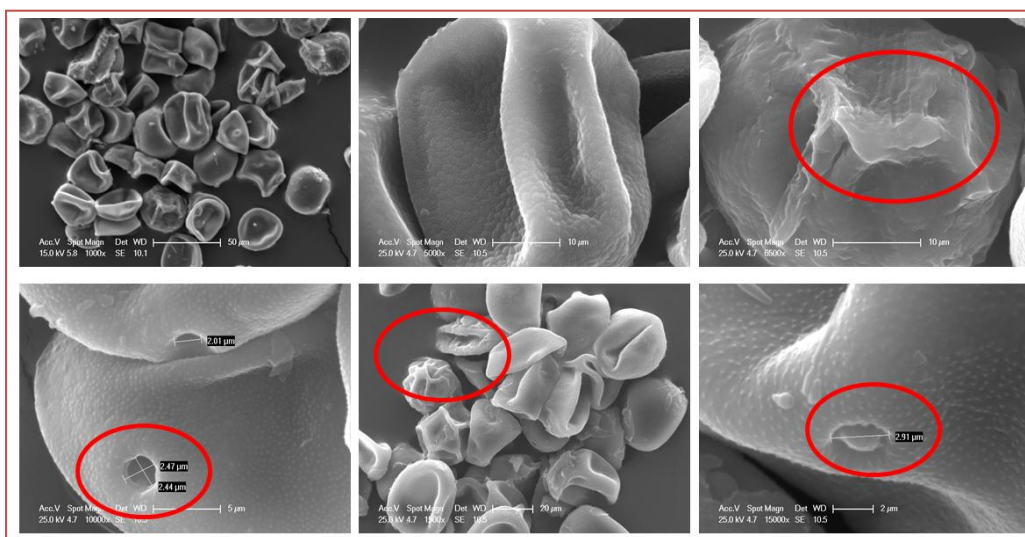


Figura 111. Efecto de la acetona sobre el polen HALAPENSE ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.3.2. Plátano

En algunos de los granos se observa una desestructuración generalizada en el grano completo. Se observa una condensación entre granos que antes no se apreciaba.

En consecuencia, se observa el efecto de la acetona entre granos.

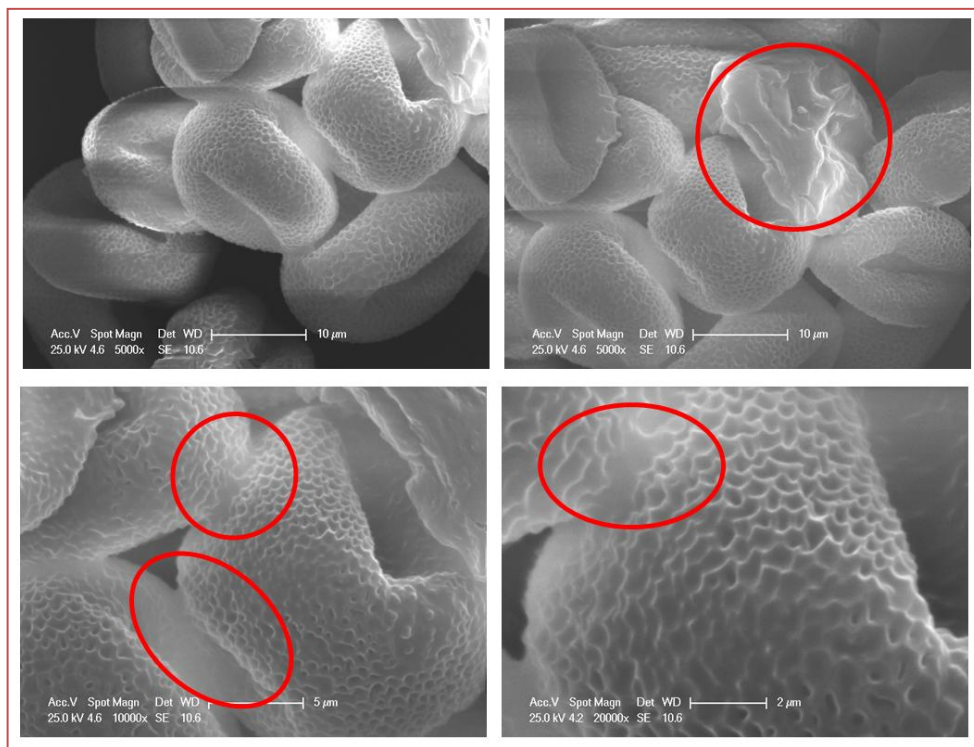
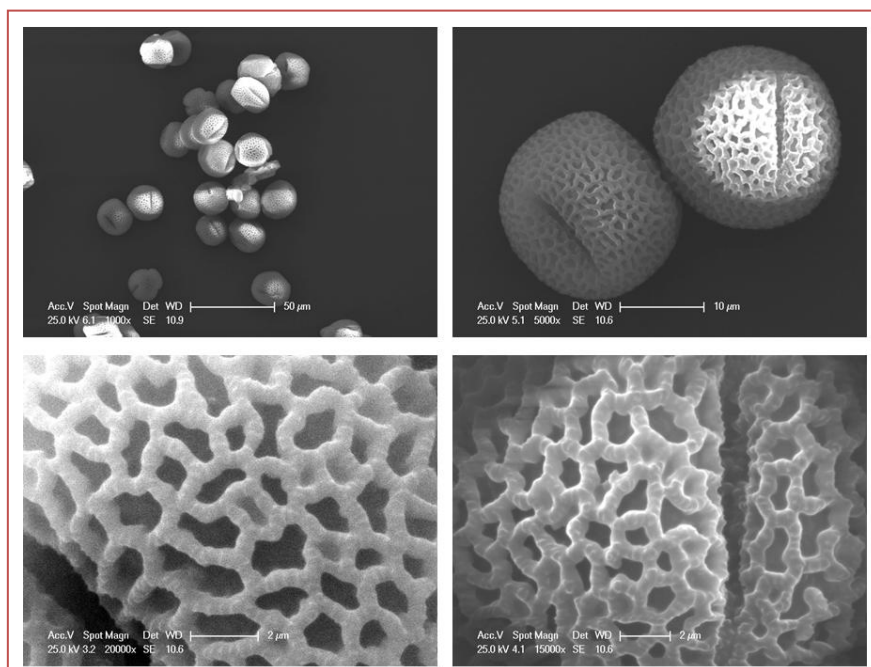


Figura 112. Efecto de la acetona sobre el polen PLÁTANO; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.3.3. Olivo

No se observa ninguna alteración en la porción de muestra estudiada. De hecho, al comparar estas con las imágenes con las presentadas en los apartados anteriores se observa una mejora en la nitidez. Esto podría atribuirse a que en la superficie del polen hubiera una capa de sustancias no conductoras que sea eliminado con la acetona. Esta capa podría ser el pollen kit descrito en la introducción.

En consecuencia, este polen no se ve aparentemente afectado por la acción de la acetona.



**Figura 113. Efecto de la acetona sobre el polen OLIVO ;
micrografías mediante SEM de los granos de polen a
distintas ampliaciones en régimen de alto vacío**

4.2.3.4. Arizónica

En algunos de los granos se observa una contracción de volumen. Las escamas observadas también estaban presentes en el polen sin modificar, no obstante, se aprecian unas vesículas esféricas menores de una micra.

En consecuencia, se observa el efecto de la en los granos de polen.

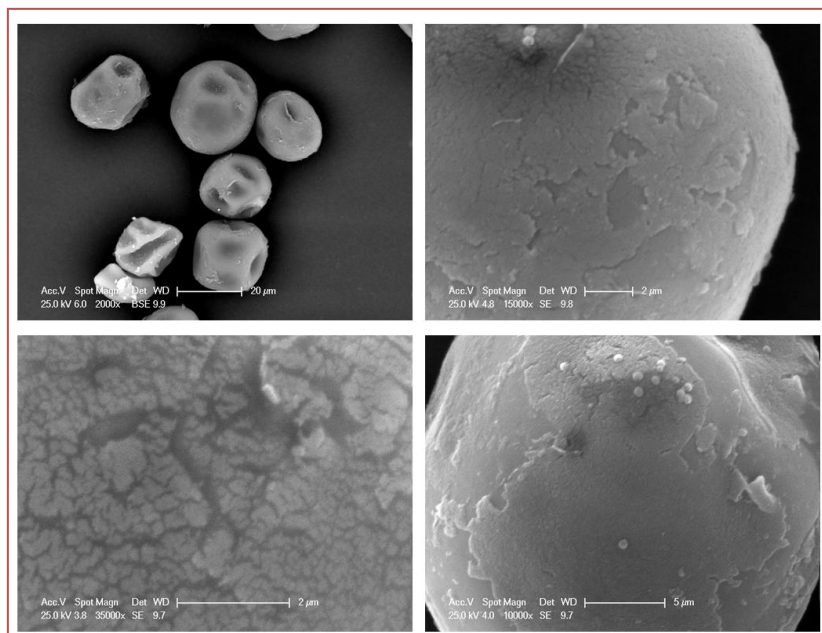


Figura 114. Efecto de la acetona sobre el polen ARIZÓNICA ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen de alto vacío

4.2.4. Partículas procedentes de vehículos

Se presentan las imágenes obtenidas en régimen ambiental y los correspondientes microanálisis de las partículas de los vehículos V3 y V4 (diesel y gasolina, respectivamente). El objetivo es estudiar si este tipo de partículas han sido encontradas en la superficie de los pólenes estudiados, en forma de contaminantes.

4.2.4.1. Vehículo V3 (diesel)

En la figura 115 se presentan las micrografías de las partículas de combustión extraídas del vehículo V3 (WPasat, 2000).

La simple observación permite indicar que se trata de partículas grandes, en torno a 200 μm de diámetro. Sin embargo, cuando se aplica un número de aumentos superior se observa que en realidad esas partículas están formadas por agregados sin evolución completa, lo cual es típico en partículas formadas a gran velocidad y elevadas temperaturas, presentando un aspecto amorfo.

En la figura 115 se observa un núcleo con agregados fundidos posiblemente debido a la elevada temperatura.

En las partículas se observan distintas tonalidades, y en ellas se han realizado diferentes microanálisis. Según la tonalidad se diferencian partículas:

1. Muy claras, debido a la presencia de gran contenido metálico;
2. Oscuras, menos metálicas, pudiendo ser agregados con menos contenido en hierro, azufre y/o platino;
3. Tonalidad intermedio, con contenidos intermedios de metales.

En las figuras 116 se muestran los resultados de microanálisis realizados en las diferentes zonas de partículas.

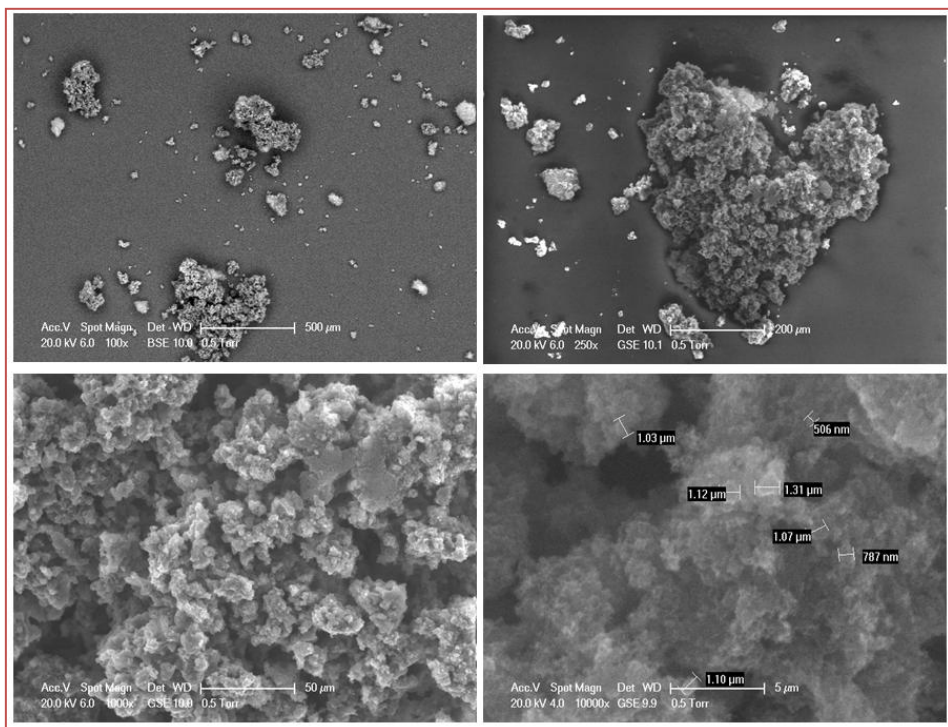


Figura 115. Partículas del tubo de combustión del vehículo V3 (WPasat diesel) ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental.

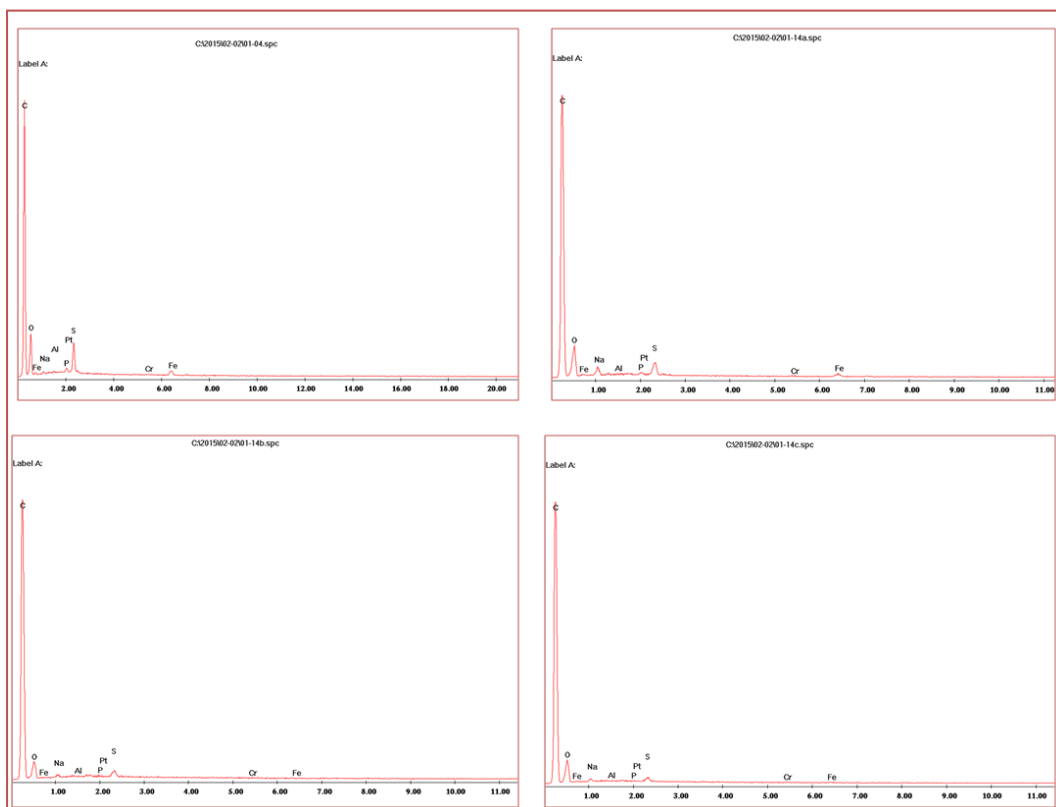


Figura 116. Microanálisis de las partículas del del tubo de combustión del vehículo V3 (WPasat diesel) en distintas zonas, por tonalidades.

4.2.4.2. Vehículo V4 (gasolina)

En la figura 117 se presentan las micrografías de las partículas de combustión extraídas del vehículo V4 (FFocus, 2000).

Visualmente se observa que se trata de agregados más pequeños que en el caso de las partículas de diesel y con mayor contenido metálico (partículas de tonalidad más claras).

Los microanálisis se han realizado de una partícula en la zona más clara y la intermedia. Como puede observarse, la zona clara tiene un contenido metálico elevado, en proporciones que podrían atribuirse al acero procedente del tubo de escape arrastrado durante el raspado para separar las partículas en la toma de la muestra (figura 118).

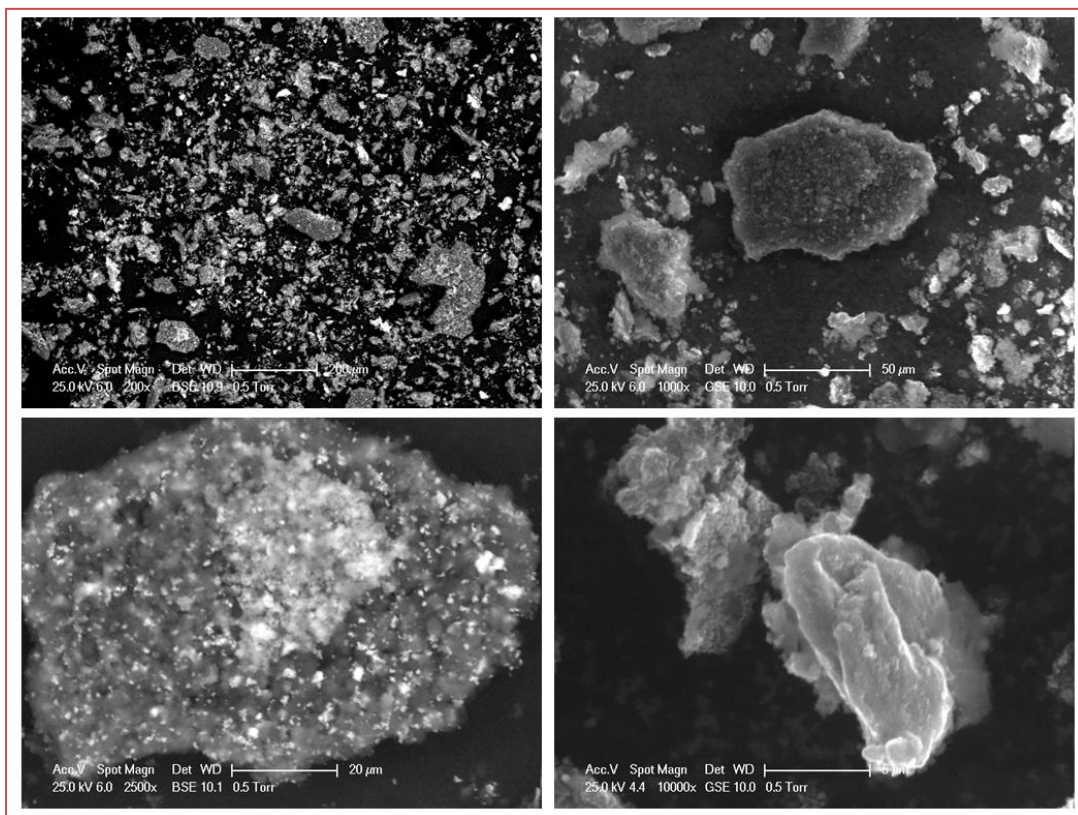


Figura 117. Partículas del tubo de combustión del vehículo V4 (FFocus gasolina) ; micrografías mediante SEM de los granos de polen a distintas ampliaciones en régimen ambiental

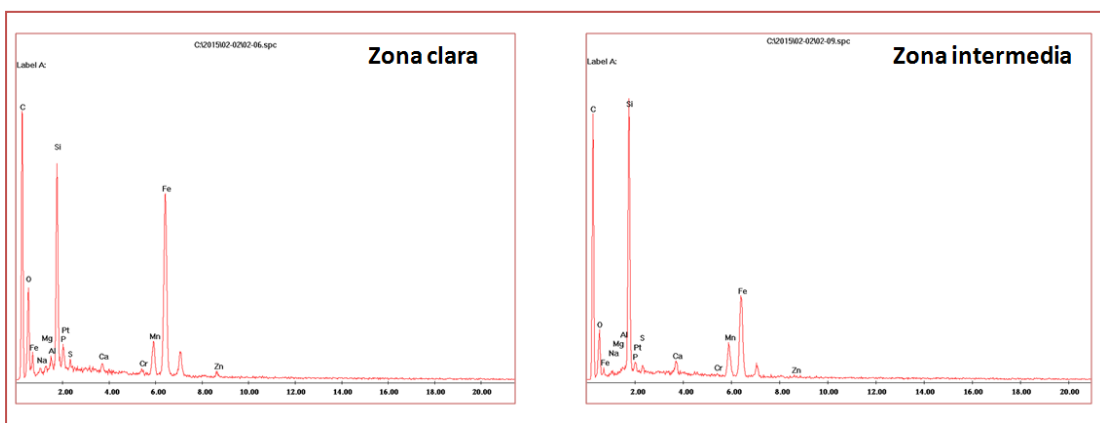


Figura 118. Microanálisis de las partículas del del tubo de combustión del vehículo V4 (FFocus gasolina) en distintas zonas, por tonalidades.

4.3. Visión global de resultados

El objetivo final del trabajo se centra en detectar la presencia de VOCs emitidos por los motores de combustión en las partículas de polen con objeto de aportar datos sobre su efecto sinérgico que potencialmente parece producir la retención de contaminantes por las partículas de polen ambiental.

Los resultados se han visualizado de formas diferentes, según se describen en los siguientes apartados.

4.3.1. Resultados del análisis de polen mediante SPME-GCMS

En las gráficas 119 se compara el contenido porcentual de compuestos orgánicos volátiles clasificados según su grupo funcional entre los distintos pólenes estudiados. Como puede observarse los alcoholes son el grupo mayoritario en los pólenes Birch, Olmo, Plátano, Poa, Fraxinus y Populus, siendo el polen Fraxinus el que mayor contenido porcentual presenta. Por lo general los ácidos carboxílicos no son un grupo predominante en los pólenes, excepto en el de Arizónica. Respecto a los mayores contenidos en derivados de benceno destacan Halapense, olmo y Arizónica, siendo el polen de Arizónica el de mayor contenido en este tipo de VOCs. Atendiendo a los compuestos minoritarios se observa que los pólenes que contienen hidracinas son el Grass y Plátano y los que contienen compuestos halogenados son el Olmo y Halapense. El compuesto del grupo “Isocianatos” que está relacionado con la producción del poliuretano aparece identificado en los pólenes Olmo, Poa, Quercus, Fraxinus, Olivo y Arizónica.

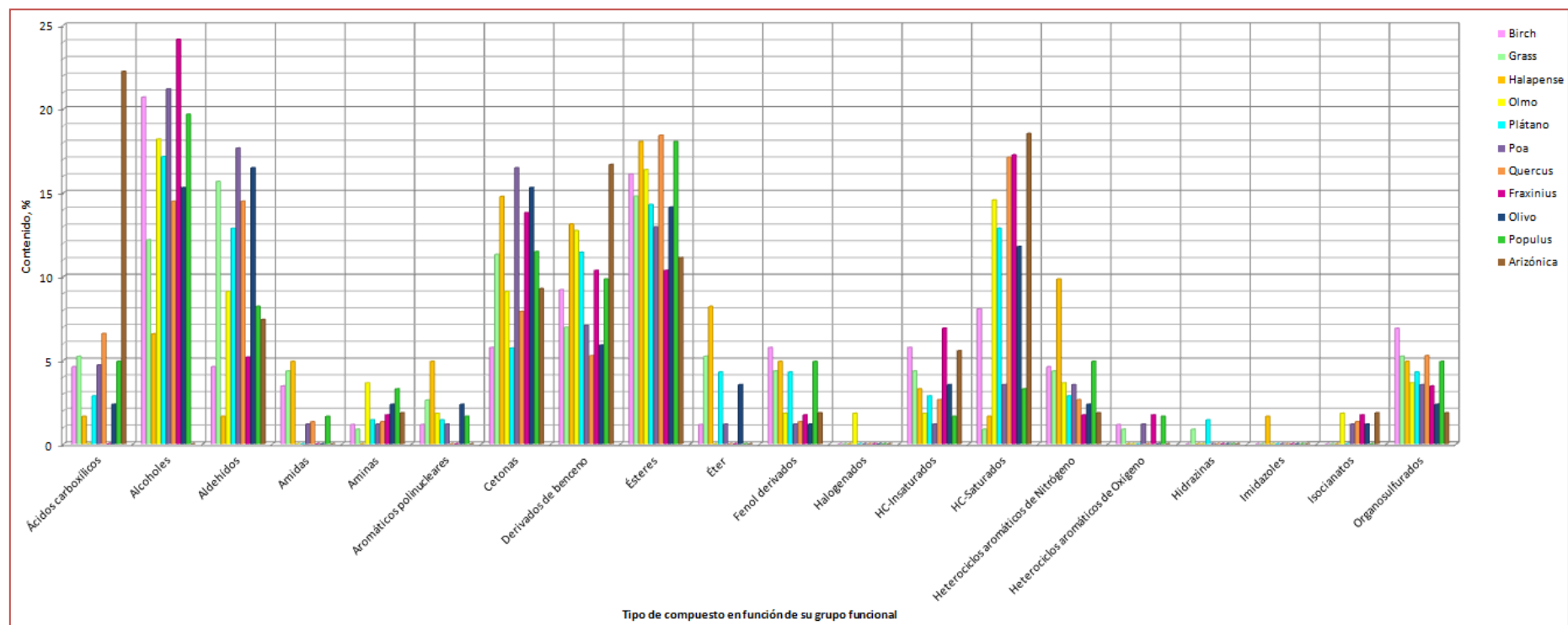


Figura 119. Comparación del contenido porcentual de compuestos orgánicos volátiles clasificados según su grupo funcional entre los distintos pólenes estudiados.

4.3.2. VOCs de combustión y su presencia en pólenes

Se estudia la posible correlación entre los VOCs procedentes de la combustión de vehículos que emplean combustible gasolina y diesel y los detectados en los pólenes.

A partir del gráfico de la figura 119, junto con la información individual de cada polen y de los VOCs identificados procedentes de los gases de combustión, se elabora la tabla 27, donde se detallan los compuestos coincidentes. Como puede observarse, se han detectado 14 contaminantes que están presentes tanto en los pólenes como en los gases de combustión del vehículo V1, 5 procedentes del vehículo V2, 22 del vehículo V3 y 5 del V4. Con respecto al benzaldehído puede proceder de los gases de combustión pero también tiene un origen natural, procedente de los aromas de muchos vegetales y flores **129, 130**.

Las gráficas de las figuras 120 y 121 se elaboran a partir de dicha tabla, obteniendo información visual sobre los contaminantes que se han encontrado en los pólenes, independientemente del tipo de combustible de vehículo. En el gráfico de la figura 120 se representan el número de compuestos, y en el gráfico de la figura 121, la concentración total de cada grupo de contaminantes. Esta distinción se justifica teniendo en cuenta que un polen puede contener, por ejemplo, un único hidrocarburo saturado común con algún vehículo; visto sólo desde este punto de vista no sería relevante, pero podría llegar a serlo si su concentración fuera elevada.

Tabla 27. Compuestos orgánicos identificados que son coincidentes en los pólenes analizados y los tubos de combustión de los vehículos estudiados

*Procedentes de gases de combustión							Concentración media detectada en cada polen, ppm										
Nº	V1	V2	V3	V4	Tipo de compuesto	Compuesto	Birch	Grass	Halapense	Olmo	Plátano	Poa	Quercus	Fraxinus	Oliv	Populus	Arizónica
1	N.D.	N.D.	X	N.D.	Ácidos carboxílicos	Acetic acid	398	238	227	N.D.	35	118	N.D.	N.D.	27	53	N.D.
2	N.D.	X	N.D.	N.D.	Aldehído	2-Hexenal	6	15	N.D.	N.D.	9	18	2	N.D.	N.D.	3	N.D.
3	N.D.	N.D.	X	N.D.	Aldehído	Tridecanal	N.D.	11	N.D.	N.D.	N.D.	5	N.D.	N.D.	14	N.D.	N.D.
4	X	X	N.D.	N.D.	Amida	Acetamide	3	3	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	X	N.D.	X	X	Aromáticos polinucleares	Naphthalene	N.D.	3	4	2	N.D.	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	X	N.D.	X	X	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 1-methyl-	N.D.	2	2	N.D.	1	N.D.	N.D.	N.D.	6	1	N.D.
7	X	N.D.	X	X	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 2-methyl-	4	2	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	N.D.	N.D.
8	X	N.D.	X	N.D.	Derivado de benceno	Ethylbenzene	10	12	7	0,13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,12	N.D.	1
9	X	N.D.	X	X	Derivado de benceno	Benzaldehyde	109	25	26	4	67	15	30	4	N.D.	62	10
10	X	N.D.	N.D.	N.D.	Derivado de benceno	Benzene, 1,3-dimethyl-	N.D.	7	9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	X	N.D.	X	N.D.	Derivado de benceno	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	X	N.D.	N.D.	N.D.	Derivado de benceno	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
13	X	N.D.	X	N.D.	Derivado de benceno	Ethylbenzene	10	12	7	0,12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,13	N.D.	1

*Procedentes de gases de combustión							Concentración media detectada en cada polen, ppm										
Nº	V1	V2	V3	V4	Tipo de compuesto	Compuesto	Birch	Grass	Halapense	Olmo	Plátano	Poa	Quercus	Fraxinus	Oliv	Populus	Arizónica
14	X	N.D.	X	X	Derivado de benceno	p-Xylene	9	26	17	2	2	4	1	3	2	1	2
15	X	N.D.	X	N.D.	Derivado de benceno	Toluene	37	85	47	7	7	9	4	6	7	2	6
16	X	N.D.	X	N.D.	Fenol derivados	Phenol	1	3	2	1	1	1	1	1	0,31	1	1
17	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	10-Methylnonadecane	12	N.D.	N.D.	N.D.	5	N.D.	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	N.D.	X	X	N.D.	HC-Saturado	Dodecane	5	N.D.	N.D.	25	32	15	0,44	N.D.	45	N.D.	3
19	N.D.	X	X	N.D.	HC-Saturado	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Eicosane	254	N.D.	12	10	6	N.D.	154	N.D.	8	N.D.	8
21	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Heptadecane	N.D.	N.D.	N.D.	62	5	N.D.	N.D.	N.D.	71	1	N.D.
22	X	X	N.D.	N.D.	HC-Saturado	Heptane	N.D.	N.D.	N.D.	41	34	N.D.	10	26	N.D.	N.D.	6
23	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Hexadecane	N.D.	4	N.D.	11	13	N.D.	2	0,4	7	N.D.	0,37
24	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Hexane	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
25	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	pentadecane	21	N.D.	N.D.	N.D.	9	N.D.	12	N.D.	N.D.	9	27
26	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Tetradecane	36	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12	N.D.	16	N.D.	N.D.
27	N.D.	N.D.	X	N.D.	HC-Saturado	Tridecane	8	N.D.	N.D.	14	N.D.	25	84	10	10	N.D.	9

*Nomenclatura asignada a los vehículos estudiados:

- V1: Vehículo Wolsvagen Polo, año 2000, gasolina;
- V2: Vehículo Wolsvagen Polo, año 2010, diesel;
- V3: Vehículo Wolsvagen Pasat, año 2000, diesel;
- V4: Vehículo Ford Focus, año 2000, gasolina.

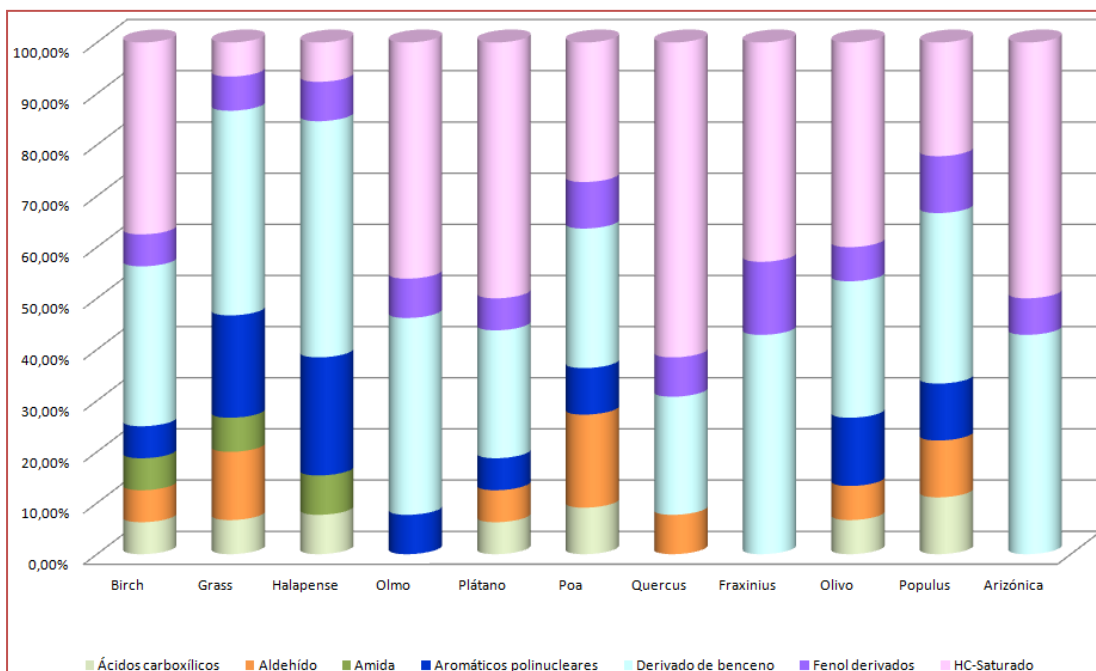


Figura 120. Contenido porcentual del número de contaminantes en pólenes procedentes de los gases de combustión.

Cómo puede observarse en la gráfica de la figura 120, el polen con mayor contenido porcentual en número de contaminantes es el Quercus. Mientras que en derivados de benceno y aromáticos polinucleares es el Halapense.

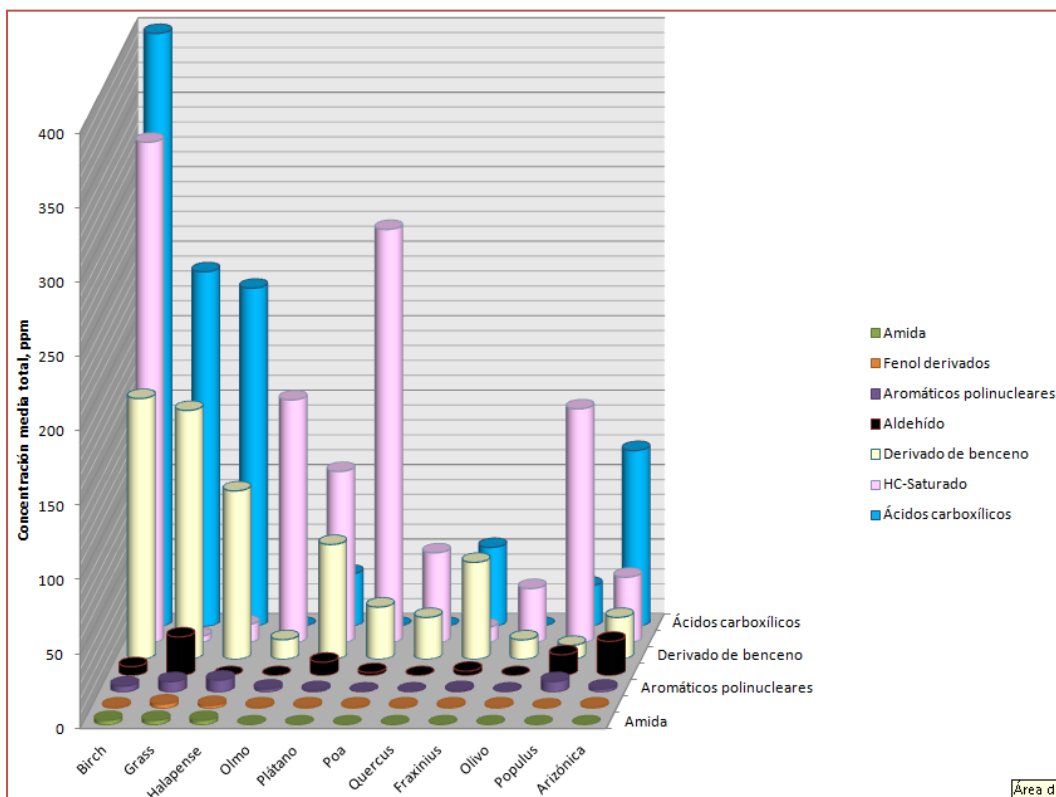


Figura 121. Concentraciones medias totales de contaminantes procedentes de gases de combustión en cada polen

La gráfica de la figura 121 pone de manifiesto que el polen Birch es el que contiene mayor concentración total media de ácidos carboxílicos, considerados como contaminantes. Los pólenes que mayor concentración media total de hidrocarburos saturados considerados como contaminantes son el Birch, Poa, Olmo y Populus. En el caso de los derivados de benceno, existe una clara diferencia de concentración entre los pólenes Birch, Gras y Halapense.

Como resumen se muestran las gráficas 122 y 123 donde se representa la concentración media de los contaminantes encontrados en los pólenes procedentes de los gases de combustión emitidos por vehículos con gasolina (V1 y V4) y vehículos con diesel (V2 y V3), respectivamente.

Aunque se encuentra fuera del objetivo de este trabajo, como complemento, en el Anexo III se presenta una tabla con los posibles contaminantes procedentes de otras fuentes distintas a los vehículos y que han sido detectados en uno o más pólenes.

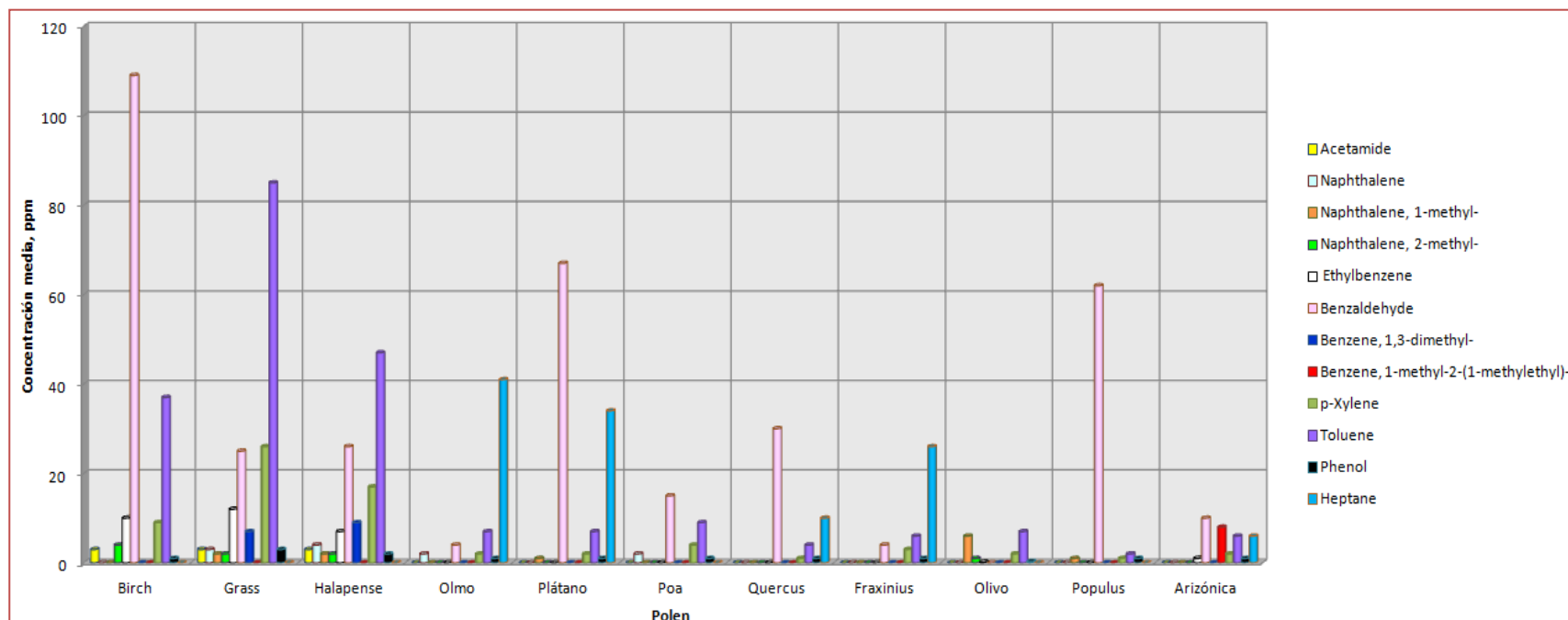


Figura 122. Concentración media de contaminantes procedentes de vehículos de gasolina detectadas en los pólenes.

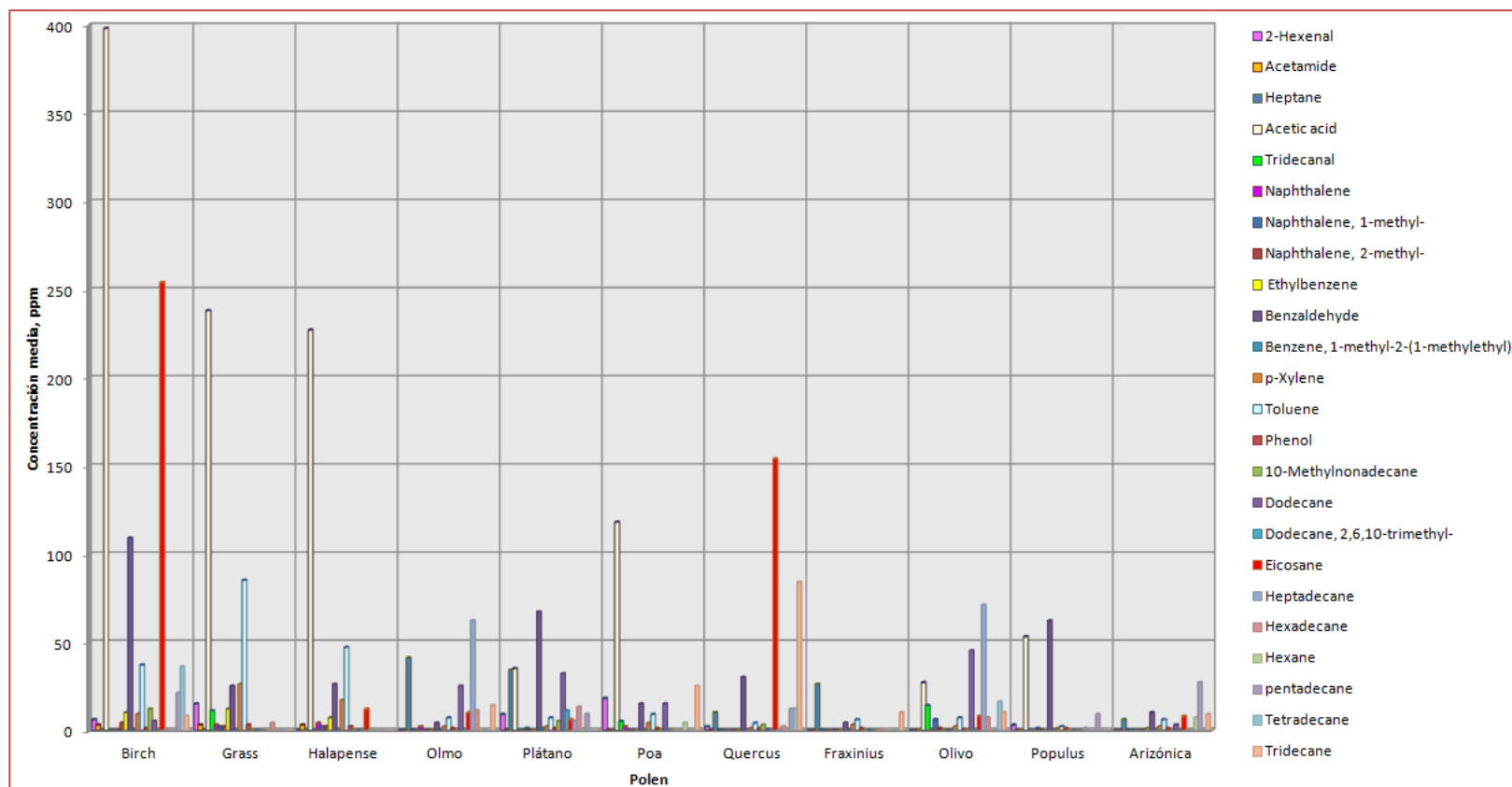


Figura 123. Concentración media de contaminantes procedentes de vehículos de diésel detectadas en los pólenes.

4.3.3. Correlación entre resultados mediante SEM y SPME-GCMS

Los resultados presentados en apartados anteriores ponen de manifiesto que se han identificado mediante SPME-GCMS algunos contaminantes procedentes de los gases de combustión o de la industria de la zona en la superficie de los pólenes, pudiéndose considerar al polen como portador de compuestos orgánicos, pudiéndose considerar como un biomarcador ambiental.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede considerar al polen como una partícula tóxica con capacidad de concentrar estos contaminantes en su superficie, ya que en el aire se encontrarían más diluidos y, por tanto, la respuesta del sistema inmune ya no sería solamente una respuesta exagerada, típica en los casos alérgicos, sino que simplemente podría producir una respuesta inmune como tal antígeno. Como tales antígenos se podrían considerar los compuestos tóxicos detectados tales como el tolueno, el tetracoloroetileno o los hidrocarburos procedentes de los gases de combustión. Esto podría relacionarse con el aumento de casos de rinitis y asma en los periodos de polinización en algunas zonas geográficas, más acusadamente en las ciudades.

La propia aplicación de la técnica introduce alguna incertidumbre en los resultados, por ejemplo:

1. ¿Soportan estos pólenes las condiciones de microextracción?, o bien, ¿los compuestos (contaminantes y naturales) identificados son realmente superficiales o la exina ha sido perturbada de tal manera que ha expuesto su contenido al exterior? Aunque en la introducción se ha encontrado bibliografía que indica que en general las partículas son resistentes, no se encuentra documentación sobre estudios de estos pólenes. Para considerar apertura del polen ¿cómo es la estructura de un polen dañado?
2. ¿Cómo se encuentran los contaminantes de combustión encontrados en los pólenes? ¿podrían encontrarse partículas procedentes de los tubos de combustión en la superficie de los pólenes?

Para poder completar este estudio dando respuestas a estas cuestiones se decidió realizar análisis mediante microscopía electrónica. De las dos

técnicas, TEM o SEM, descritas brevemente en introducción, SEM parecía ser la más apropiada, ya que aporta información similar a la de un microscopio óptico con altísima resolución, mientras que TEM es menos apropiada para obtener información morfológica, debido a que el haz penetra en la muestra y su información está más relacionada con la ordenación atómica que, en este caso, daría información sobre la ordenación de las distintas membranas en el polen.

Con todo esto, se realizaron los ensayos necesarios para completar el estudio. Como resultados transversales al objetivo principal, se presenta en la tabla 28 un resumen de la descripción morfológica obtenida en las partículas de diesel y de gasolina.

Tabla 28. Descripción morfológica de las partículas procedentes de los tubos de escape.

Muestra	*Descripción
Partículas diesel	Partículas de (200 – 500) μm formada por agregados sin separarse, con contenido metálico.
Partículas gasolina	Partículas con agregados de hasta 300 nm y núcleos metálicos sueltos
⁺ Pólenes sometidos a 70°C	No se observa ninguna alteración en la exina
⁺ Pólenes atacados con acetona	En todos se observan alteraciones en exina y/o granos, excepto en el olivo.

* En todos los casos se indica el tamaño medio observado;

⁺ Pólenes estudiados: Halapense, Plátano, Olivo y Arizónica.

Globalmente, no se han encontrado partículas ajenas al polen de tamaños comprendidos entre 500 μm y 200 nm en su superficie, excepto en el polen Halapense, donde se han encontrado partículas de 8 μm , aproximadamente, en algunos granos de polen. Estas partículas exógenas al polen no se pueden atribuir a partículas de combustión procedentes de vehículos ya que al comprarlos con las micrografías obtenidas en las partículas de los vehículos son diferentes, el diesel y/o gasolina son agregados de distintos tamaños, mientras que la forma de las partículas encontradas en la superficie del Halapense están bien definidas y son de tamaño mayor. Además, en este mismo polen, se han apreciado en algunos casos irregularidades de la

exina en forma de aguja y redondeadas. Estas imperfecciones no se pueden atribuir a una exina abierta o dañada por algún reactivo orgánico, ya que al compararlo con las micrografías de este polen tratado con acetona, son diferentes. Cuando la exina del polen es perturbada con agentes químicos, aparecen orificios y el grano del polen se contrae perdiendo volumen.

A partir de los análisis elementales realizados en los pólenes se puede concluir que no se detectan elementos distintos a los propios de muestras biológicas, excepto al polen Halapense, donde existen cantidades elevadas de Ca en las imperfecciones, que no aparecen en los granos con la exina intacta.

Las micrografías obtenidas de los pólenes sometidos a las mismas condiciones de temperatura y tiempo de tratamiento que las de SPME indican que no se han producido alteraciones en la exina del polen. Por tanto, se puede concluir que tras la extracción SPME el polen no se altera significativamente, no observándose aperturas en la exina y, en consecuencia, los compuestos identificados mediante SPME-GCMS deben encontrarse en la superficie, incluidos los contaminantes de combustión.

En las micrografías obtenidas de los pólenes tratados con acetona se puede observar cómo se modifica la exina excepto en el polen de olivo, que parece ser más resistente a agente. Con estos resultados y comparándolos con los obtenidos a 70°C durante 1 hora, se puede concluir que realmente a esas temperaturas la exina permanece sin alterar.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

5.1. Globales

- Existe correlación entre los VOCs procedentes de los tubos de combustión y los VOCs exógenos presentes en los pólenes.
- En estas correlaciones destaca la presencia de: 1-metil-naftaleno y 2-metil-naftaleno, hidrocarburos saturados, tales como dodecano, tetradecano y n-hexadecano, junto con derivados de benceno, tales como el tolueno, etilbenceno y p-xileno.
- Entre los compuestos correlacionados, el 1-metil-naftaleno y 2-metil-naftaleno están presentes en los gases de combustión únicamente del vehículo diesel antiguo.
- Se han detectado otros VOCs exógenos no procedentes de los motores de combustión, destacando:
 - el elevado contenido de tetracloroetileno en el polen Halapense, procedente de la industria textil.
 - la presencia en todos los pólenes de al menos un derivado de imidazol, compuestos que podrían estar relacionados con pesticidas. En el caso del polen Halapense, se han detectado 4 imidazoles diferentes.
 - la presencia del compuesto ¹N,N-dimetil formamida en Birch, Grass y Halapense, compuesto relacionado con la industria general y de pesticidas, en particular. Cabe destacar que este compuesto se ha detectado en los tres pólenes de origen estadounidense, pudiendo ser un contaminante ligeramente local.
 - la identificación de dos hidracinas en los pólenes Grass y Plátano, pudiendo relacionarse con la fabricación de polímeros.
- Se puede considerar el polen intrínsecamente como una sustancia tóxica potencial debido a su capacidad de retención de compuestos

¹ Ver Anexo III, donde se describen la presencia de otros contaminantes encontrados en el polen y no identificados en los gases de combustión de los vehículos estudiados.

perjudiciales presentes en el ambiente, cuya naturaleza es función de la zona geográfica.

- Los resultados aportados pueden resultar de utilidad para nuevos estudios sobre los aspectos de respuesta inmune frente al polen.
- En conjunto, el polen podría ser útil como marcador de la contaminación ambiental.

5.2. SPME-GCMS:

- El diseño factorial ha permitido la optimización del método SPME utilizando un número de experimentos relativamente pequeño.
- El análisis de componentes principales ha permitido obtener información de forma sencilla sobre el comportamiento de las fibras frente a los VOCs contenidos en el polen.
- La fibra más adecuada, por su versatilidad en cuanto al número de compuestos retenidos, es la fibra azul clara.
- El empleo de fibras aclopadas al tubo de combustión ha permitido detectar los VOCs producidos con el vehículo en movimiento.

5.3. SEM

- La técnica SEM ha permitido estudiar la morfología de la exina y detectar la presencia o ausencia de partículas exógenas al polen, además de la estructura de las partículas procedentes de los tubos de combustión.
- Se ha verificado que los pólenes no han experimentado cambio en su estructura superficial en las condiciones de trabajo en SPME, por lo que los compuestos detectados son claramente exógenos con retención superficial sobre el polen. Sin embargo el tratamiento con disolventes orgánicos como la acetona provoca importantes alteraciones en la exina de los pólenes estudiados, excepto en el polen olivo.
- En el polen Halapense, se han detectado dos tipos de partículas exógenas con elevados contenidos en calcio, si bien sus limitaciones de sensibilidad no han permitido establecer su naturaleza.

- La composición elemental del polen no muestra la presencia de metales pesados, siendo una composición característica de muestras biológicas
- Las partículas procedentes de los tubos de combustión contienen metales pesados, tales como Pt y Fe, componentes del catalizador y del propio tubo, respectivamente.

CAPÍTULOS 6, 7, 8 Y 9

ANEXOS I, II, III Y IV

6. ANEXO I: Identificación y semicuantificación de VOCs en pólenes mediante GCMS

Tabla 29. Resultados muestra de polen BIRCH

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								CC. media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Ácidos carboxílicos	Acetic acid	22,9	N.D.	N.D.	N.D.	3.274.674	N.D.	2.247.144	N.D.	102.045.115	398
2	Cetonas	2-Propanone, 1-hydroxy-	26,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	355.325	4
3	Ácidos carboxílicos	Propanoic acid	30,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.227.997	69
4	Derivados de benceno	Toluene	30,4	252.116	N.D.	253.898	789.577	1.601.096	N.D.	N.D.	13.896.452	37
5	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.302.567	26
6	Alcoholes	Propylene Glycol	33,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	455.700	N.D.	N.D.	5
7	Amidas	Formamide, N,N-dimethyl-	34,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	811.934	9
8	Alcoholes	2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	35,3	N.D.	N.D.	101.347	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
9	Derivados de benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	872.559	10
10	Amidas	Acetamide	36,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	252.380	3
11	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	238.192	118.709	N.D.	N.D.	2.088.253	9
12	Cetonas	Ethanone, 1-(2-methyl-2-cyclopenten-1-yl)-	37,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	307.505	3
13	Aldehídos	2-Hexenal	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	534.483	6

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
14	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	145.973	N.D.	N.D.	2.766.343	16
15	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	206.462	7.425.602	N.D.	3.767.978	N.D.	11.750.850	64
16	Ésteres	Hexanoic acid, methyl ester	39,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	619.324	7
17	Ácidos carboxílicos	Pentanoic acid	39,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.189.579	13
18	Ésteres	Oxalic acid, isobutyl pentyl ester	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	165.454	2
19	Heterociclos aromáticos de Oxígeno	Furan, 2-pentyl-	41,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	297.632	3
20	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	317.302	1.355.208	N.D.	232.925	162.553	N.D.	5
21	Derivados de benceno	benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.856.400	109
22	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	296.543	162.894	N.D.	N.D.	1.666.086	8
23	Ácidos carboxílicos	Hexanoic acid	43,1	N.D.	N.D.	1.172.677	3.338.197	3.156.393	427.812	N.D.	25.445.854	74
24	Éter	Allyl(ethoxy)dimethylsilane	43,3	N.D.	N.D.	N.D.	4.783.265	1.130.195	N.D.	N.D.	N.D.	33
25	Organosulfurados	Dimethyl sulfone	43,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	540.737	N.D.	N.D.	6
26	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	1.158.240	N.D.	N.D.	1.132.629	6.788.331	N.D.	14

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
27	Ésteres	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	43,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.257.436	25
28	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	908.028	N.D.	N.D.	10
29	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	976.390	N.D.	N.D.	11
30	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	94.527	256.794	N.D.	119.707	97.275	N.D.	1
31	Alcoholes	Glycerin	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	5.558.937	N.D.	9.005.980	6.952.798	N.D.	60
32	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.702.557	N.D.	N.D.	N.D.	19
33	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	559.791	4.673.838	1.276.964	2.598.717	2.256.059	5.189.269	27
34	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	929.405	N.D.	N.D.	3.018.799	22
35	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	1.202.990	1.094.454	N.D.	233.026	4.185.870	18
36	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	3-Aminopyrazole	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.201.725	N.D.	N.D.	N.D.	13
37	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	600.950	N.D.	4.027.817	26
38	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	107.121	N.D.	826.021	787.758	1.756.948	N.D.	N.D.	9.978.356	30
39	HC-Insaturados	1-Dodecene	47,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.129.390	N.D.	N.D.	N.D.	13

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
40	Alcoholes	1-Tetradecanol	47,8	42.847	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,5
41	Amidas	2-Pyrrolidinone	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	987.377	N.D.	N.D.	11
42	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	1.267.678	2.511.577	2.261.729	871.157	1.443.920	7.541.190	27
43	Derivados de benceno	Benzene, 1,4-dimethoxy-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.538.097	17
44	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	40.732	N.D.	N.D.	N.D.	0,5
45	Ésteres	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	48,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.403.692	N.D.	N.D.	1.619.691	N.D.	10
46	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.692.002	30
47	HC-Saturados	Octane	49,5	6.044.801	2.350.097	6.193.748	23.572.711	11.248.414	3.046.351	16.787.726	N.D.	89
48	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	49,9	1.126.568	N.D.	2.451.185	7.503.783	2.966.439	2.691.665	5.074.504	N.D.	33
49	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.494.076	28
50	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.497.631	39
51	HC-Saturados	Dodecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	490.903	5
52	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.656.986	N.D.	N.D.	18

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
53	Organosulfurados	Thiophene, 2,5-dihydro-	51,7	N.D.	N.D.	821.484	N.D.	487.572	727.457	641.529	N.D.	6
54	HC-Insaturados	alpha-cubebene	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	539.544	624.591	N.D.	N.D.	971.192	8
55	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	52,1	N.D.	N.D.	645.587	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.697.340	30
56	Organosulfurados	Thiophene, 2,3-dihydro-	52,2	N.D.	N.D.	434.888	995.076	320.663	1.276.850	435.515	721.458	7
57	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 2-methyl	52,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	371975,0	4
58	HC-Insaturados	Copaene	52,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.052.631	N.D.	N.D.	N.D.	12
59	HC-Saturados	Tridecane	53,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.010.270	N.D.	8
60	Fenol derivados	3-allyl-3-methoxyphenol	53,1	N.D.	N.D.	1.508.705	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17
61	Organosulfurados	Sulfurous acid, pentadecyl 2-propyl ester	53,2	N.D.	695.341	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
62	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	945.983	10
63	Ésteres	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	53,8	1.434.865	N.D.	3.253.482	1.815.603	4.701.939	2.175.481	1.853.221	N.D.	26
64	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	682.932	N.D.	3.379.719	N.D.	6.147.502	1.900.494	1.084.893	15.265.883	51
65	Alcoholes	n-Tridecan-1-ol	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	165.597	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
66	HC-Insaturados	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	54,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.118.357	N.D.	N.D.	1.438.309	14
67	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	448.555	N.D.	N.D.	1.408.423	N.D.	N.D.	10
68	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	174.406	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
69	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-4-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.006.194	N.D.	N.D.	11
70	HC-Saturados	Tetradecane	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	5.366.126	N.D.	N.D.	5.021.633	N.D.	36
71	HC-Saturados	10-Methylnonadecane	55,2	N.D.	1.051.716	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12
72	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-6-methyl-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.121.613	N.D.	N.D.	35
73	HC-Saturados	Pentadecane	55,4	1.525.840	N.D.	1.917.079	N.D.	2.247.802	N.D.	N.D.	N.D.	21
74	Fenol derivados	Butylated Hydroxytoluene	55,5	1.381.299	N.D.	2.332.023	N.D.	3.652.666	N.D.	N.D.	4.369.738	33
75	Derivados de benceno	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	56,0	829.621	N.D.	669.730	990.286	2.775.286	N.D.	N.D.	4.408.163	21

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC. media, ppm
76	Alcoholes	Ethenol, 2-(tetradecyloxy)	56,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	883.499	10
77	Fenol derivados	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	56,2	N.D.	N.D.	767.038	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9
78	Fenol derivados	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	56,2	140.390	N.D.	N.D.	N.D.	980.026	509.941	N.D.	N.D.	6
79	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.761.560	N.D.	N.D.	20
80	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.712.297	19
81	Alcoholes	Isophytol	57,7	N.D.	N.D.	427.766	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5
82	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	589.221	N.D.	1.246.218	675.547	829.805	N.D.	8
83	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	594.422	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
84	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.407.665	16
85	HC-Saturados	Eicosane	61,8	13.240.001	19.446.558	20.448.441	53.767.486	20.588.510	20.614.447	51.192.514	N.D.	254
86	Derivados de benceno	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-3-phenyl-	62,1	1.175.541	N.D.	1.565.495	1.258.939	2.535.385	776.670	1.220.331	3.343.934	17
87	Alcoholes	Ethanol, 2-(hexadecloxy)	62,4	N.D.	N.D.	710.243	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8

Tabla 30. Resultados de muestras de polen GRASS

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								CC media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Ácidos carboxílicos	Acetic acid	22,9	N.D.	N.D.	N.D.	5.721.375	N.D.	3.806.393	N.D.	81.983.935	238
2	Aldehídos	2-Butenal, (E)-	23,2	N.D.	N.D.	N.D.	5.300.467	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	59
3	Cetonas	1-penten-3-one	25,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.037.197	8
4	Cetonas	2-Propanone, 1-hydroxy-	26,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	376.730	3
5	Ácidos carboxílicos	Propanoic acid	30,3	N.D.	N.D.	N.D.	8.071.495	N.D.	2.015.320	N.D.	47.649.357	155
6	Derivados de benceno	Toluene	30,4	1.329.229	N.D.	N.D.	N.D.	4.951.482	N.D.	N.D.	24.990.305	85
7	Aldehídos	2-Pentenal, (E)-	31,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	817.815	6
8	Ésteres	Acetic acid, methyl ester	33,2	N.D.	N.D.	N.D.	573.158	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
9	Cetonas	1-Hydroxy-2-butanone	33,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.501.242	33
10	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	1.880.059	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21
11	Cetonas	3-Penten-2-one, 4-methyl-	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.647.592	12
12	Amidas	Formamide, N,N-dimethyl-	34,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.247.045	9
13	Alcoholes	2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	35,3	N.D.	N.D.	150.429	1.426.775	N.D.	517.869	N.D.	N.D.	8
14	Alcoholes	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-	35,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	562.298	N.D.	N.D.	6
15	Derivados de benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	233.041	N.D.	N.D.	3.009.920	12

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								CC media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
16	Amidas	Acetamide	36,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	447.049	3
17	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	176.160	871.405	N.D.	N.D.	8.906.862	26
18	Heterociclos aromáticos de Oxígeno	3-Furaldehyde	36,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	955.698	7
19	Cetonas	Ethanone, 1-(2-methyl-2-cyclopenten-1-yl)-	37,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	279.031	2
20	Aldehídos	2-Hexenal	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	869.274	N.D.	N.D.	N.D.	2.850.764	15
21	Cetonas	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	37,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	253.771	2
22	Derivados de benceno	Benzene, 1,3-dimethyl-	37,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.009.597	7
23	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	615.039	21.793.318	1.700.360	10.898.709	2.809.690	22.191.449	93
24	Ésteres	Hexanoic acid, methyl ester	39,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	421.192	3
25	Aldehídos	2,4-hexadienal, (E,E)	40,1	N.D.	N.D.	N.D.	1.530.888	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17
26	Amidas	Acetamide, N-ethyl-	40,8	N.D.	N.D.	N.D.	409.090	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5
27	Derivados de benceno	Oxime-, methoxy-phenyl-	41,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	187.896	N.D.	N.D.	N.D.	2
28	Aldehídos	2-Heptenal, (E)-	41,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.101.799	N.D.	N.D.	N.D.	357.157	7
29	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	529.770	N.D.	N.D.	N.D.	6
30	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	319.389	N.D.	N.D.	184.372	222.392	N.D.	2
31	Derivados de benceno	benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	1.249.329	675.195	N.D.	N.D.	7.045.701	25
32	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	2.527.147	272.751	N.D.	289.028	1.226.784	10

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
33	Ácidos carboxílicos	Hexanoic acid	43,1	N.D.	N.D.	1.051.29 3	5.863.460	1.316.254	841.646	523.654	7.367.106	26
34	Éteres	Allyl(ethoxy)dimethylsilane	43,3	N.D.	N.D.	N.D.	4.873.269	N.D.	N.D.	1.858.172	N.D.	29
35	Organosulfurados	Dimethyl sulfone	43,4	N.D.	N.D.	N.D.	1.635.964	N.D.	2.948.816	1.191.125	N.D.	18
36	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	3.608.55 6	N.D.	N.D.	1.043.610	6.220.270	N.D.	23
37	Aldehídos	2,4-Heptadienal, (E,E)-	43,6	N.D.	N.D.	N.D.	2.045.536	456.501	N.D.	N.D.	N.D.	14
38	Ésteres	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	43,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	894.415	N.D.	N.D.	582.332	7
39	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	797.492	N.D.	N.D.	9
40	Amina	Ethamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	736.979	N.D.	N.D.	8
41	Aldehídos	2,4-Heptadienal, (E,S)-	44,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	679.452	5
42	Alcoholes	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	44,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	126.911	N.D.	0,3
43	Cetonas	3-Octen-2-one	44,8	N.D.	N.D.	N.D.	920.508	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
44	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	125.365	519.842	N.D.	227.163	187.498	N.D.	3
45	Alcoholes	2-Propanol, 1,1'-oxybis-	45,3	N.D.	N.D.	N.D.	1.100.702	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12
46	Alcoholes	Glycerin	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	5.719.700	N.D.	8.624.795	12.666.412	N.D.	64
47	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	259.597	N.D.	N.D.	1.094.869	5
48	Aldehídos	Benzeneacetaldehyde	45,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	34.421	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
49	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	374.432	10.937.456	919.460	2.553.978	2.901.177	6.934.190	37
50	Cetonas	2-Cyclohexene-1,4-dione	45,9	N.D.	N.D.	N.D.	1.936.037	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21
51	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	210.052	1.389.943	1.588.182	N.D.	N.D.	3.669.847	12

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								CC media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
52	Alcoholes	2-Propanol, 1,1'-[(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis(oxy)]bis-	46,4	N.D.	N.D.	N.D.	8.056.759	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	89
53	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	163.487	N.D.	2.735.067	482.843	2.927.541	7.591.748	20
54	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	3-Aminopyrazole	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.699.019	N.D.	N.D.	N.D.	19
55	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	46,7	N.D.	N.D.	615.848	N.D.	N.D.	N.D.	1.577.800	N.D.	5
56	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	198.333	909.693	1.894.841	N.D.	N.D.	4.399.727	16
57	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	54.569	N.D.	571.838	400.939	1.781.855	N.D.	N.D.	7.396.310	17
58	HC-Insaturados	1-Dodecene	47,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	511.152	N.D.	N.D.	N.D.	6
59	Amidas	2-Pyrrolidinone	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	3.248.509	N.D.	922.655	707.645	N.D.	16
60	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	193.294	1.131.991	469.370	N.D.	N.D.	1.295.720	7
61	Aldehídos	2,6-Nonadienal, (E,E)-	48,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	438.446	N.D.	N.D.	N.D.	5
62	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	1.318.354	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
63	Ésteres	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	48,7	N.D.	N.D.	N.D.	579.245	N.D.	N.D.	591.991	N.D.	4
64	Amidas	N-Methyl-2-pyrrolidone	48,8	N.D.	N.D.	N.D.	2.147.483	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24
65	Ácidos carboxílicos	Octanoic Acid	49,0	N.D.	N.D.	N.D.	1.124.100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
66	Cetonas	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	49,0	N.D.	N.D.	N.D.	5.786.731	N.D.	2.455.198	10.078.421	N.D.	39
67	Ésteres	Nonanoic acid, methyl ester	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.149.719	N.D.	N.D.	2.126.740	14
68	Aldehídos	Decanal	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	1.550.289	322.644	N.D.	N.D.	N.D.	10
69	Aromáticos polinucleares	Naphthalene	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	400.868	3
70	Ésteres	2(3H)-furanone, 5-acetyldihydro	49,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	536.570	N.D.	1
71	Ésteres	4-Methoxycarbonyl-4-butanolide	49,8	N.D.	N.D.	N.D.	2.175.325	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24
72	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.737.733	28
73	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.328.414	40
74	Aldehídos	2-Decenal, (E)-	50,9	N.D.	N.D.	N.D.	3.365.527	708.790	N.D.	1.066.229	N.D.	16
75	Ácidos carboxílicos	Nonanoic acid	51,1	N.D.	N.D.	N.D.	4.306.770	N.D.	2.091.329	2.569.904	N.D.	26
76	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.911.209	N.D.	N.D.	54
77	Fenol derivados	4-mthoxyphenol o Mequinol	51,2	N.D.	N.D.	802.965	2.855.662	1.462.320	N.D.	2.318.072	N.D.	16
78	Organosulfurados	Thiophene, 2,5-dihydro-	51,7	N.D.	N.D.	613.845	3.699.814	1.224.237	856.347	1.830.168	N.D.	15
79	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 1-methyl	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	231.381	2

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
80	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	52,1	N.D.	N.D.	115.578	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.159.439	9
81	HC-Insaturados	1-heptadecene	52,1	1.555.421	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17
82	Organosulfurados	Thiophene, 2,3-dihydro-	52,2	N.D.	N.D.	438.167	1.420.009	527.473	1.562.863	1.010.368	755.963	9
83	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 2-methyl	52,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	229.495	2
84	Cetonas	2-Heptanone, 6-methyl-	52,4	N.D.	N.D.	N.D.	1.308.448	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
85	Aldehídos	Tridecanal	53,3	N.D.	N.D.	N.D.	997.273	562.843	N.D.	1.960.903	N.D.	17
86	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.406.639	10
87	HC-Insaturados	2-Pentene, 3-methyl-, (Z)-	53,6	N.D.	N.D.	N.D.	1.688.169	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	19
88	Hidracinas	Hydrazine, 1,1-dimethyl-2-propyl-	53,7	N.D.	N.D.	545.819	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
89	Ésteres	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	53,8	1.845.883	N.D.	2.638.460	N.D.	4.276.127	N.D.	1.029.496	3.351.696	25
90	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	N.D.	N.D.	760.938	N.D.	N.D.	N.D.	3.284.925	1.639.583	10
91	Alcoholes	n-Tridecan-1-ol	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	2.639.931	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	29
92	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	123.050	N.D.	N.D.	184.721	N.D.	N.D.	2
93	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	409.167	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
94	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-4-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	678.143	N.D.	N.D.	8
95	Fenol derivados	Vanillin	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	271.323	N.D.	1
96	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-6-methyl-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	798.283	N.D.	N.D.	9
97	Aldehídos	17-Octadecenal	55,4	N.D.	N.D.	N.D.	2.578.625	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	29
98	Alcoholes	Ethanol, 2-(tetradecyloxy)	56,0	905.639	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
99	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	N.D.	368.399	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
100	Fenol derivados	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	56,2	807.918	N.D.	639.701	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
101	Fenol derivados	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	56,2	807.918	N.D.	N.D.	N.D.	889.887	N.D.	N.D.	1.162.980	9
102	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.604.279	N.D.	N.D.	29
103	Éteres	Oxirane, decyl-	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.305.477	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14
104	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.558.544	12
105	Aldehídos	Tetradecanal	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	856.082	N.D.	2
106	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	282.653	N.D.	1.088.868	362.053	N.D.	N.D.	6

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								CC media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
107	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	736.312	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
108	Ésteres	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	60,0	N.D.	N.D.	N.D.	214.543	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
109	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.752.434	13
110	Alcoholes	1, 12-dodecanediol	60,6	N.D.	N.D.	N.D.	214.543	N.D.	N.D.	1.708.905	N.D.	3
111	Aldehídos	hexadecanal	60,6	N.D.	N.D.	N.D.	1.256.627	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14
112	Organosulfurados	2-imino-3-ethylbenzothiazoline	61,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	643.357	N.D.	N.D.	7
113	Derivados de benceno	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-3-phenyl-	62,1	1.065.332	N.D.	842.247	N.D.	1.265.675	N.D.	N.D.	2.462.554	13
114	Alcoholes	Ethanol, 2-(hexadecloxy)	62,4	N.D.	N.D.	408.177	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5

Tabla 31. Resultados muestras de polen HALAPENSE

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
1	Ácidos carboxílicos	Acetic acid	22,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30.565.226	227
2	Cetonas	2-Propanone, 1-hydroxy-	26,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	445.102	3
3	Éteres	1-Propene, 3,3'-oxybis-	28,0	N.D.	N.D.	N.D.	3.132.239	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
4	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	1H-Imidazole, 2-ethenyl-	28,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.390.688	10
5	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2-Propen-1-amine, N-2-propenyl-	29,0	N.D.	N.D.	2.750.780	12.296.740	6.278.554	4.517.563	N.D.	71.749.032	141
6	Derivados de benceno	Toluene	30,4	1.112.240	N.D.	745.267	2.448.344	8.039.896	N.D.	N.D.	23.649.158	47
7	Halogenados	Tetrachloroethylene	32,5	20.578.706	N.D.	6.605.311	23.384.702	59.880.735	796.080	N.D.	223.888.012	383
8	HC-Insaturados	2-Pentene, 3,4-dimethyl-, (E)-	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	3.173.732	N.D.	N.D.	113.773	N.D.	4
9	Cetonas	3-Penten-2-one, 4-methyl-	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.322.123	N.D.	N.D.	12.428.112	49
10	Amidas	Formamide, N,N-dimethyl-	34,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	446.676	3
11	Derivados de benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	308.385	N.D.	N.D.	1.836.198	7

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
12	Amidas	Acetamide	36,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	355.658	3
13	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	563.692	1.044.613	N.D.	N.D.	6.188.788	17
14	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	Pyridine, 3-methyl-	37,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.813.465	13
15	Cetonas	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	37,4	N.D.	N.D.	2.147.764	3.372.280	9.724.757	N.D.	N.D.	16.249.774	50
16	Derivados de benceno	Benzene, 1,3-dimethyl-	37,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.182.361	9
17	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	1.088.790	N.D.	829.958	N.D.	1.621.931	10
18	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	265.540	N.D.	N.D.	N.D.	1
19	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	116.225	N.D.	N.D.	72.411	N.D.	N.D.	1
20	Derivados de benceno	benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.498.374	26
21	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	6.259.471	N.D.	N.D.	567.013	4.627.482	N.D.	36
22	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	701.511	N.D.	N.D.	12
23	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	32.745	156.487	N.D.	73.501	1.607.370	N.D.	2
24	Alcoholes	Glycerin	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	265.871	N.D.	767.583	620.042	N.D.	5

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
25	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	123.279	5.361.649	548.699	2.115.882	2.586.873	2.454.840	13
26	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.756.240	N.D.	N.D.	4.943.452	22
27	Derivados de benceno	Acetophenone	46,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	108.187	1
28	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.924.687	N.D.	N.D.	N.D.	12
29	Amidas	N,N-Diallylformamide	46,6	N.D.	N.D.	385.805	772.910	904.693	N.D.	N.D.	N.D.	4
30	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.507.632	N.D.	N.D.	N.D.	10
31	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	772.910	N.D.	N.D.	432.273	N.D.	2
32	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	252.797	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.939.853	31
33	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	65.104	N.D.	292.209	N.D.	N.D.	949.746	3
34	Cetonas	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	49,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	175.547	N.D.	N.D.	N.D.	1
35	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	741.867	N.D.	2
36	Aromáticos polinucleares	Naphthalene	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	465.815	4

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
37	Cetonas	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-5-methyl-	49,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	440.673	3
38	Cetonas	2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	49,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	664.526	N.D.	N.D.	11
39	Alcoholes	1-penten-3-ol-2-methyl	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	2.280.867	N.D.	N.D.	1.791.264	N.D.	5
40	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	213.448	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
41	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 1-methyl	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	161.809	2
42	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	52,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.656.986	N.D.	N.D.	28
43	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 2-methyl	52,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	167.619	2
44	Ésteres	Hexadecanoic acid, methyl ester	53,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.350.381	N.D.	6
45	Organosulfurados	Sulfurous acid, pentadecyl 2-propyl ester	53,2	N.D.	N.D.	1.241.501	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17
46	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	368.986	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11
47	Ésteres	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	53,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.289.779	10
48	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	637.975	N.D.	2.043.505	484.493	N.D.	N.D.	N.D.	3.471.863	16

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
49	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	184.552	N.D.	N.D.	3
50	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	312.253	N.D.	N.D.	425.143	N.D.	N.D.	6
51	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-4-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	403.583	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
52	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-6-methyl-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.178.678	N.D.	N.D.	37
53	Fenol derivados	Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)4-methoxy	55,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.002.247	4.117.500	N.D.	14
54	Fenol derivados	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	56,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	562.539	N.D.	N.D.	N.D.	2
55	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanediyl)oxy]]bis-Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	57,1	N.D.	N.D.	226.509	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
56	Ésteres	Diethyl Phthalate	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.578.974	N.D.	N.D.	61
57	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl	58,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.118.245	8
58	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl	59,7	290.105	N.D.	311.583	N.D.	651.038	989.007	1.415.215	N.D.	6

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	CC media, ppm
		ester										
59	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	632.245	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9
60	HC-Saturados	Eicosane	61,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.591.383	12
61	Derivados de benceno	1H-Indene, 2,3- dihydro-1,1,3- trimethyl-3-phenyl-	62,1	N.D.	N.D.	N.D.	979.724	N.D.	N.D.	1.977.996	N.D.	4

Tabla 32. Resultados muestras de polen OLMO

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
				Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.259.101	9
2	Halogenados	Cloro metano	29,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	80.186	N.D.	N.D.	N.D.	0,3
3	Derivados de benceno	Toluene	30,4	538.624	N.D.	N.D.	881.098	3.208.437	N.D.	N.D.	N.D.	7
4	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	Pyrrrole	33,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	405.280	3
5	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	959.899	7
6	Derivados de benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17.354	0,1
7	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	486.878	N.D.	N.D.	172.721	2
8	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	350.650	3
9	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	989.592	N.D.	368.377	N.D.	9.985.476	28
10	Aldehídos	Heptanal	38,7	N.D.	N.D.	N.D.	2.443.448	263.071	N.D.	N.D.	N.D.	4
11	Ésteres	Oxalic acid, isobutyl pentyl ester	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	196.395	1
12	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	354.159	N.D.	N.D.	N.D.	1
13	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	592.967	N.D.	N.D.	70.207	876.426	15.311.450	31
14	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	1.451.024	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
15	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	238.984	N.D.	N.D.	4.873.999	19
16	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	1.956.704	N.D.	N.D.	1.082.847	2.922.152	N.D.	18

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
17	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	397.489	N.D.	N.D.	7
18	Alcoholes	1-Hexanol, 2-ethyl-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	581.916	N.D.	N.D.	3.225.441	13
19	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.168.216	N.D.	N.D.	20
20	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	38.009	1.030.180	N.D.	N.D.	56.501	N.D.	1
21	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	520.459	N.D.	N.D.	908.590	4
22	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	532.006	3.661.180	920.716	1.449.577	1.689.915	4.521.639	14
23	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	612.636	N.D.	N.D.	674.557	4
24	Aldehídos	Nonanal	46,5	309.580	N.D.	527.651	16.752.251	8.710.457	310.673	1.589.711	73.252.992	92
25	Derivados de benceno	Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	46,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	138.246	N.D.	N.D.	N.D.	1
26	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	661.671	N.D.	N.D.	N.D.	3
27	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	318.626	N.D.	N.D.	N.D.	1
28	HC-Saturados	Heptane	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.590.337	41
29	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	101.159	N.D.	80.086	N.D.	56.945	431.693	1
30	HC-Insaturados	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	499.467	4
31	Ésteres	Pantolactone	49,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	212.326	N.D.	1
32	Derivados de benceno	Benzyl nitrile	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	608.738	N.D.	N.D.	540.519	3
33	Aldehídos	Decanal	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.525.237	41

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
34	Aromáticos polinucleares	Naphthalene	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	312.966	2
35	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	49,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	109.885	1
36	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	50,0	N.D.	N.D.	567.026	N.D.	462.578	N.D.	N.D.	N.D.	5
37	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	644.140	5
38	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	838.379	6
39	HC-Saturados	Undecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	700.174	N.D.	N.D.	22.004.442	83
40	HC-Saturados	Dodecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.429.550	25
41	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.420.241	N.D.	N.D.	24
42	Ésteres	Hexadecanoic acid, methyl ester	53,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.215.234	N.D.	6
43	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	3.003.766	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	41
44	HC-Saturados	Tridecane	53,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.857.239	14
45	Ésteres	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	53,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.016.629	N.D.	2.038.019	N.D.	11

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
46	Hetericiclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	1.311.303	N.D.	N.D.	1.511.300	N.D.	N.D.	22
47	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	1.443.457	N.D.	N.D.	1.637.001	N.D.	N.D.	24
48	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	1.801.158	339.560	N.D.	1.300.097	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11
49	Aminas	Morpholine, 4-octadecyl-	56,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21.776.172	N.D.	57
50	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanediyl oxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.761.759	N.D.	N.D.	30
51	HC-Saturados	Heptadecane	58,4	N.D.	N.D.	N.D.	22.963.953	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	62
52	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	304.960	N.D.	N.D.	181.989	N.D.	653.152	4
53	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	839.912	1.206.461	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
54	HC-Saturados	Eicosane	61,7	N.D.	451.385	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.887.107	N.D.	10
55	HC-Saturados	Heneicosane	61,8	N.D.	N.D.	N.D.	1.563.729	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4

Tabla 33. Resultados muestras de polen PLÁTANO

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.464.314	11
2	Ácido Carboxílico	Acetic Acid	23,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.725.526	35
3	Alcoholes	1-Butanol, 3-methyl-	30,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	475.244	4
4	Derivados de benceno	Tolueno	30,5	N.D.	N.D.	179.646	N.D.	3.106.454	N.D.	N.D.	702.682	7
5	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	455.930	N.D.	N.D.	N.D.	1.920.089	8
6	Aldehídos	2-Butenal, 3-methyl-	33,7	N.D.	N.D.	N.D.	199.967	N.D.	N.D.	N.D.	1.497.845	6
7	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	228.054	417.348	N.D.	N.D.	369.655	2
8	Aldehídos	2-Hexenal, (E)-	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.208.478	9
9	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	39.966	N.D.	N.D.	1.831.018	7
10	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	3.110.438	N.D.	1.381.518	N.D.	9.529.496	34
11	Ésteres	Oxalic acid, isobutyl pentyl ester	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	251.151	2
12	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	187.039	N.D.	N.D.	N.D.	1
13	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	364.606	N.D.	N.D.	138.062	517.178	N.D.	3
14	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.298.401	2.018.508	N.D.	N.D.	25.002.293	67
15	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	154.202	N.D.	N.D.	1.502.391	6
16	Ácido Carboxílico	Hexanoic acid	43,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	198.175	N.D.	N.D.	N.D.	1

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
17	Derivados de benceno	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	43,2	N.D.	N.D.	65.852	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
18	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	5.452.908	N.D.	N.D.	892.316	2.574.661	N.D.	32
19	Ésteres	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	43,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	320.871	N.D.	N.D.	N.D.	1
20	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	915.032	N.D.	N.D.	16
21	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.523.086	N.D.	N.D.	26
22	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	79.327	254.255	N.D.	N.D.	111.220	N.D.	1
23	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	962.269	2.224.283	N.D.	236.355	6.410.300	15
24	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	69.350	N.D.	2.757.190	13.254.737	9.797.148	2.889.378	6.526.898	29.558.016	57
25	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	974.167	N.D.	N.D.	1.379.095	7
26	Derivados de benceno	Acetophenone	46,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.793.583	73
27	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	50.761	1.080.418	2.402.459	N.D.	278.569	3.902.212	9
28	Éteres	Tetrahydrofuran, 2-ethyl-5-methyl-	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.734.582	N.D.	N.D.	N.D.	7
29	Derivados de benceno	Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	933.958	N.D.	N.D.	N.D.	4
30	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	246.780	N.D.	N.D.	N.D.	1
31	Derivados de benceno	Benzene, (1-methyl-1-propenyl)-, (Z)-	47,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	114.728	N.D.	N.D.	N.D.	0,5
32	HC-Saturados	Heptane	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	923.542	N.D.	N.D.	8.627.682	34

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
33	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	N.D.	1.702.793	3.809.359	505.961	1.177.221	7.285.084	17
34	Alcoholes	1-Nonanol	48,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	504.939	N.D.	N.D.	N.D.	2
35	Aldehídos	2,6-Nonadienal, (E,E)-	48,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	186.143	N.D.	N.D.	N.D.	1
36	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	128.236	N.D.	N.D.	N.D.	1
37	Alcoholes	2H-Pyran-3-ol, 6-ethenyltetrahydro-2,2,6-trimethyl-	49,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.044.549	N.D.	N.D.	2.224.932	10
38	Ésteres	Nonanoic acid, methyl ester	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	102.821	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
39	Aldehídos	Decanal	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.564.048	12
40	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.378.935	10
41	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.514.148	19
42	HC-Saturados	Dodecane	50,2	622.661	N.D.	N.D.	N.D.	4.761.967	N.D.	N.D.	9.499.535	32
43	Cetonas	2-Butanone, 4-phenyl-	51,0	233.425	N.D.	865.898	653.116	4.993.457	N.D.	631.729	4.972.092	12
44	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.337.371	N.D.	N.D.	23
45	Fenol derivados	Thymol	51,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.003.607	7
46	Aldehídos	2-Propenal, 3-phenyl-	51,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.199.778	N.D.	N.D.	N.D.	5
47	Aromáticos polinucleares	Naphtalene, 1-methyl	51,98	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	169750	1
48	Organosulfurados	Thiophene, 2,5-dihydro-	52,18	N.D.	N.D.	106156	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.												
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
49	Fenol derivados	3,4-Diethylphenol	52,3	N.D.	N.D.	64.447	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
50	HC-Insaturados	Copaene	52,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	972.608	7
51	HC-Saturados	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	52,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.498.115	11
52	Hidracinas	Hydrazine, 1-methyl-1-(2-methylpropyl)-	52,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.104.528	N.D.	6
53	Éteres	Propane, 1-ethoxy-2-methyl-	52,8	N.D.	N.D.	1.067.875	2.268.973	2.181.100	1.600.597	N.D.	N.D.	14
54	Ésteres	Phthalic acid, hexyl undecyl ester	53,7	N.D.	N.D.	N.D.	2.269.621	N.D.	N.D.	N.D.	1.485.323	9
55	Ésteres	Phthalic acid, decyl isobutyl ester	53,8	664.066	N.D.	4.229.179	N.D.	3.588.824	2.980.087	3.813.057	N.D.	28
56	HC-Saturados	Pentadecane	54,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.631.777	N.D.	1.306.215	3.147.408	9
57	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	488.520	N.D.	N.D.	829.390	N.D.	N.D.	10
58	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	453.552	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
59	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-4-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.212.479	N.D.	N.D.	21
60	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	847.175	438.711	N.D.	1.780.190	2.205.938	N.D.	N.D.	3.642.882	13
61	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.612.206	N.D.	N.D.	28
62	Éteres	Oxirane, decyl-	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	384.938	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
63	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	648.319	5
64	HC-Insaturados	8-Heptadecene	58,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	538.272	N.D.	N.D.	N.D.	2
65	HC-Saturados	Heptadecane	58,4	N.D.	N.D.	N.D.	1.251.108	1.058.951	N.D.	1.181.509	1.224.684	5
66	HC-Saturados	10-Methylnonadecane	58,4	480.359	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	604.783	5
67	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	442.031	N.D.	583.425	412.182	622.602	N.D.	4
68	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	730.208	N.D.	839.696	530.338	N.D.	N.D.	7
69	HC-Saturados	Eicosane	61,8	792.032	N.D.	N.D.	2.263.537	1.330.043	N.D.	1.908.619	N.D.	6

Tabla 34. Resultados muestras polen POA

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.260.613	61
2	Ácidos carboxílicos	Acetic Acid	23,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15.919.620	118
3	Ácidos carboxílicos	Propanoic acid	30,4	N.D.	N.D.	885.582	2.960.640	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
4	Derivados de benceno	Tolueno	30,5	735.366	N.D.	N.D.	N.D.	2.527.844	N.D.	N.D.	N.D.	9
5	Aldehídos	2-Pentenal, (E)-	31,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	831.252	6
6	Alcoholes	2-Penten-1-ol, (Z)-	32,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.009.484	22
7	Cetonas	1-Hydroxy-2-butanone	33,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.560.631	19
8	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	1.798.595	N.D.	N.D.	N.D.	5.618.623	23
9	Alcoholes	3-Pentanol, 2-methyl-	35,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	517.896	4
10	Alcoholes	2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	35,3	N.D.	N.D.	911.093	2.978.783	934.651	1.310.669	1.085.931	694.907	9
11	Aldehídos	2-Pentenal, 2-methyl-	35,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.551.041	11
12	Alcoholes	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-	35,7	N.D.	N.D.	397.890	1.321.770	342.119	729.464	639.957	N.D.	5
13	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	377.665	424.246	N.D.	N.D.	1.148.629	4
14	Cetonas	Ethanone, 1-(3-methylenecyclopentyl)-	37,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	179.260	1
15	Aldehídos	2-Hexenal, (E)-	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.429.050	18
16	Cetonas	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	37,4	N.D.	N.D.	299.746	593.717	1.138.537	N.D.	N.D.	679.088	4
17	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	761.435	6

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
18	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	285.334	10.701.920	600.811	5.200.595	1.927.408	15.547.958	41
19	Alcoholes	Ethanol, 2-butoxy-	39,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.470.908	N.D.	N.D.	14.208.287	56
20	HC-Saturados	hexane	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	564.036	4
21	Heterociclos aromáticos de Oxígeno	Furan, 2-pentyl-	41,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	437.128	3
22	Aldehídos	2-Heptenal, (Z)-	41,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	268.907	N.D.	N.D.	898.560	4
23	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	336.655	N.D.	N.D.	N.D.	1
24	Alcoholes	1-Octen-3-ol	42,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	42.018	N.D.	N.D.	2.088.067	8
25	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	219.079	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
26	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	1.774.688	676.453	N.D.	N.D.	5.102.463	15
27	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	771.651	474.089	N.D.	N.D.	1.613.673	5
28	Ácidos carboxílicos	Hexanoic acid	43,1	N.D.	N.D.	171.176	14.730.142	1.091.774	1.361.139	2.655.992	1.336.661	14
29	Organosulfurados	Dimethyl sulfone	43,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	880.579	N.D.	2
30	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	6.020.579	N.D.	N.D.	1.593.327	3.313.199	N.D.	40
31	Ésteres	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl-	43,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	915.481	N.D.	N.D.	N.D.	4
32	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.159.914	N.D.	N.D.	20
33	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.562.157	N.D.	N.D.	27
34	Aldehídos	2,4-Heptadienal, (E,E)-	44,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	456.489	N.D.	N.D.	1.336.661	6
35	Alcoholes	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	44,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	343.071	N.D.	1

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
36	Cetonas	3-Octen-2-one	44,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	587.463	N.D.	N.D.	2.353.118	10
37	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	64.652	N.D.	262.857	N.D.	281.469	N.D.	1
38	Alcoholes	Glycerin	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.172.262	N.D.	6
39	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	96.259	N.D.	683.072	N.D.	N.D.	N.D.	2
40	Aldehídos	Benzeneacetaldehyde	45,6	N.D.	N.D.	N.D.	1.873.453	866.947	N.D.	N.D.	1.938.153	8
41	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	792.181	12.971.792	1.882.144	3.234.217	7.020.604	8.082.569	31
42	Cetonas	2-Cyclohexene-1,4-dione	45,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	621.210	5
43	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	1.442.061	919.290	943.647	235.844	N.D.	37.013.641	61
44	HC-Insaturados	2-Nonyne	46,1	536.480	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
45	Derivados de benceno	Acetophenone	46,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.309.805	17
46	Ácidos carboxílicos	Heptanoic acid	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	3.058.144	N.D.	N.D.	423.683	N.D.	5
47	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	109.969	3.407.103	2.351.986	N.D.	1.146.856	4.786.339	12
48	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	3-Aminopyrazole	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	911.123	2.346.450	N.D.	N.D.	N.D.	6
49	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	241.352	N.D.	877.679	629.582	6.256.331	N.D.	N.D.	14.946.960	30
50	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5- ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	368.498	N.D.	651.972	N.D.	N.D.	1.252.652	6
51	Cetonas	6-Methyl-3,5- heptadiene-2-one	47,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	452.390	3

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
52	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	359.846	1.199.405	943.291	N.D.	500.460	3.190.423	7
53	Alcoholes	1-Nonanol	48,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	695.182	N.D.	N.D.	1.111.489	6
54	Aldehídos	2,6-Nonadienal, (E,E)-	48,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	170.458	N.D.	N.D.	N.D.	1
55	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	253.682	N.D.	224.271	N.D.	1
56	Amidas	2-Pyrrolidinone	48,8	N.D.	N.D.	N.D.	1.347.914	552.126	N.D.	N.D.	2.057.540	7
57	Alcoholes	Ethanol, 1-(2-butoxyethoxy)-	49,2	N.D.	N.D.	638.904	1.820.150	3.870.298	N.D.	547.439	8.048.890	18
58	Alcoholes	5-Dodecenol	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	426.975	N.D.	1
59	Aromáticos polinucleares	Naphthalene	49,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	333.629	2
60	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	49,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.062.237	8
61	HC-Saturados	Dodecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.053.901	15
62	Cetonas	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	1.717.258	N.D.	3.137.674	N.D.	1.018.630	22
63	Aldehídos	Undecanal	51,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.675.695	12
64	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	1.359.349	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	19
65	HC-Saturados	Tridecane	53,1	N.D.	1.446.946	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.253.289	N.D.	25
66	Ésteres	Phthalic acid, hexyl undecyl ester	53,7	1.916.085	N.D.	2.928.849	2.071.945	3.137.392	N.D.	N.D.	850.214	17
67	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	N.D.	N.D.	525.109	1.617.046	N.D.	N.D.	N.D.	1.205.907	7
68	Cetonas	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	54,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	745.409	6

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
69	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	834.544	N.D.	N.D.	1.083.851	N.D.	N.D.	15
70	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6- methyl-	55,0	N.D.	N.D.	1.322.348	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	18
71	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.416.267	N.D.	N.D.	24
72	Aldehídos	Tetradecanal	55,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.269.085	9
73	Aldehídos	Tridecanal	55,4	N.D.	N.D.	N.D.	1.945.935	1.092.711	N.D.	N.D.	N.D.	5
74	Aldehídos	17-Octadecenal	55,4	N.D.	N.D.	N.D.	1.614.295	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
75	Cetonas	3-Buten-2-one, 4-(2,6,6- trimethyl-1-cyclohexen- 1-yl)-	55,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	608.303	5
76	Cetonas	3-Buten-2-one, 4-(2,2,6- trimethyl-7- oxabicyclo[4.1.0]hept-1- yl)-	56,2	N.D.	N.D.	326.318	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
77	Alcoholes	1-Undecanol	56,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.298.705	N.D.	3
78	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1- ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.406.252	N.D.	1.032.646	24
79	Éter	Oxirane, decyl-	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.019.377	N.D.	N.D.	1.264.192	N.D.	3
80	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl- , 1-(1,1-dimethylethyl)-2- methyl-1,3-propanediyl ester	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	709.024	5

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
81	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	1.075.422	N.D.	502.343	N.D.	N.D.	536.194	N.D.	611.605	8
82	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	376.051	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5
83	Ésteres	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	60,0	363.554	N.D.	1.353.612	997.406	N.D.	1.232.586	1.709.218	3.129.835	12
84	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	930.582	7
85	Derivados de benceno	Benzophenone	60,6	N.D.	N.D.	365.127	1089130	1.938.520	N.D.	1.694.250	N.D.	5

Tabla 35. Resultados muestra de polen QUERCUS

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Aldehídos	Pentanal	26,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.278.830	54
2	Derivados de benceno	Tolueno	30,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	951.146	N.D.	N.D.	N.D.	4
3	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	2.633.489	367.812	N.D.	N.D.	7.098.114	20
4	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	95.724	N.D.	N.D.	192.301	1
5	Aldehídos	2-Hexenal, (E)-	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	225.870	2
6	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	189.233	N.D.	N.D.	2.335.004	9
7	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	313.335	N.D.	N.D.	5
8	Aldehídos	Heptanal	38,7	N.D.	N.D.	N.D.	3.810.549	616.777	N.D.	N.D.	7.844.227	24
9	Aldehídos	2-Heptenal, (E)-	41,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	638.060	5
10	Ésteres	Formic acid, heptyl ester	41,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	459.134	N.D.	N.D.	2.249.142	9
11	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	515.490	N.D.	N.D.	333.417	655.487	9.736.386	22
12	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.201.442	977.561	N.D.	N.D.	10.975.147	30
13	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	209.440	3.711.626	1.579.319	N.D.	N.D.	11.026.334	25
14	Ácidos carboxílicos	Hexanoic acid	43,1	N.D.	N.D.	7.482.517	19.430.155	179.722	2.733.619	1.504.447	14.054.942	52
15	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	1.777.536	N.D.	N.D.	1.605.221	4.670.498	N.D.	21
16	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.461.289	N.D.	N.D.	25
17	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.534.375	N.D.	N.D.	26

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
18	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	87.796	N.D.	N.D.	N.D.	62.807	N.D.	1
19	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	401.600	1.089.924	1.131.347	N.D.	N.D.	2.509.952	8
20	Aldehídos	2-Octenal, (E)-	45,6	N.D.	N.D.	N.D.	2.251.966	816.549	N.D.	3.176.360	N.D.	6
21	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	1.284.324	6.471.492	1.976.211	1.766.197	2.901.986	6.062.497	21
22	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	370.551	3
23	Cetonas	2-Nonanone	46,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	143.902	N.D.	N.D.	1.048.516	4
24	Ácidos carboxílicos	Heptanoic acid	46,4	N.D.	N.D.	5.401.634	N.D.	N.D.	4.114.345	1.748.864	N.D.	50
25	Aldehídos	Nonanal	46,5	538.931	N.D.	N.D.	26.903.071	13.349.765	N.D.	N.D.	28.254.560	85
26	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	515.430	N.D.	542.431	N.D.	372.749	1.562.015	5
27	HC-Saturados	Heptane	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.298.795	10
28	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	485.052	N.D.	779.024	282.192	464.224	1.349.286	5
29	Alcoholes	n-Pentadecanol	48,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	908.867	N.D.	2
30	Alcoholes	1-Nonanol	48,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	199.906	1
31	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	2.566.089	1.501.233	153.676	814.307	4.582.941	10
32	Amidas	2-Pyrrolidinone	48,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	579.530	4
33	Cetonas	2-Decanone	48,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.420.114	11
34	Ácidos carboxílicos	Octanoic Acid	49,0	N.D.	N.D.	2.658.655	19.906.768	5.494.548	4.879.339	6.093.541	N.D.	42
35	Ésteres	Nonanoic acid, methyl ester	49,2	99.555	N.D.	N.D.	N.D.	1.560.621	N.D.	N.D.	N.D.	4
36	Aldehídos	Decanal	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.267.903	17
37	Alcoholes	3-Buten-2-ol, 2-	49,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.110.957	23

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
38	HC-Saturados	methyl-Octadecane	49,5	7.859.373	N.D.	8.302.773	35.023.727	10.659.759	4.636.012	24.712.516	N.D.	81
39	HC-Saturados	Nonadecane	49,6	N.D.	3.692.153	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13.512.974	103
40	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	49,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.221.317	N.D.	N.D.	1.793.352	9
41	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	49,9	4.061.298	N.D.	8.024.269	26.433.699	7.090.573	9.202.992	23.689.554	6.721.342	75
42	CEtonas	2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	49,9	N.D.	880.093	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	25
43	HC-Saturados	Undecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	975.930	N.D.	N.D.	3.159.461	14
44	HC-Saturados	Dodecane	50,2	40.036	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
45	Aldehídos	2-Decenal, (E)-	50,9	N.D.	N.D.	N.D.	2.206.942	1.360.773	N.D.	1.141.573	2.703.113	9
46	Ácidos carboxílicos	Nonanoic acid	51,1	N.D.	N.D.	N.D.	20.584.613	N.D.	4.894.380	12.427.913	N.D.	57
47	Ácidos carboxílicos	Octanoic Acid	51,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.908.635	N.D.	N.D.	N.D.	16
48	Organosulfurados	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.834.293	N.D.	N.D.	83
49	Organosulfurados	Sulfurous acid, 2-pentyl tetradecyl ester	51,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.292.835	10
50	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-butyl dihydro-	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	1.013.974	2.432.897	N.D.	N.D.	4.273.058	15
51	Cetonas	6-Dodecanone	52,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.338.401	10
52	Alcoholes	2-Butyl-2,7-octadien-1-ol	52,9	N.D.	N.D.	N.D.	1.770.017	N.D.	N.D.	N.D.	2.356.011	11
53	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-	53,1	N.D.	N.D.	4.991.749	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	69

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
		methyl-										
54	HC-Saturados	Tridecane	53,3	N.D.	2.927.280	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	84
55	Ésteres	Phthalic acid, hexyl undecyl ester	53,7	469.490	N.D.	N.D.	2.604.961	N.D.	N.D.	N.D.	5.600.056	18
56	Ésteres	Phthalic acid, isobutyl undecyl ester	53,7	N.D.	N.D.	5.910.592	2.861.311	N.D.	1.866.449	2.046.232	N.D.	32
57	Ésteres	Phthalic acid, isobutyl nonyl ester	53,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.696.864	N.D.	N.D.	N.D.	19
58	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	3.180.836	N.D.	1.642.253	1.393.932	3.037.367	635.498	820.411	5.671.886	18
59	Ésteres	Pentanoic acid, 4-methyl-, pentyl ester	54,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.662.903	12
60	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	1.998.428	N.D.	N.D.	1.331.077	N.D.	N.D.	25
61	Ésteres	.delta. Nonalactone	54,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	592.550	4
62	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.300.442	N.D.	N.D.	22
63	HC-Saturados	Tetradecane	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	4.341.273	N.D.	N.D.	N.D.	1.574.566	12
64	HC-Saturados	Pentadecane	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.612.113	N.D.	12
65	HC-Saturados	10-Methylnonadecane	55,2	1.345.018	1.647.199	1.632.411	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	28
66	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-6-methyl-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.073.623	N.D.	N.D.	18
67	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	N.D.	N.D.	N.D.	723.574	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.												
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
68	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanediyl oxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.558.224	N.D.	N.D.	44
69	HC-Saturados	10-Methylnonadecane	58,4	241.925	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
70	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	611.734	N.D.	N.D.	1.318.199	917.985	249.158	9
71	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	888.776	N.D.	1.567.581	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16
72	HC-Saturados	Nonadecane	61,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.751.775	N.D.	N.D.	116
73	Alcoholes	1-Heneicosanol	61,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12.064.691	N.D.	32
74	HC-Insaturados	1-Nonadecene	61,2	N.D.	2.784.449	N.D.	N.D.	2.259.149	N.D.	N.D.	N.D.	45
75	HC-Insaturados	10-Heneicosene (c,t)	61,2	2.972.465	N.D.	3.897.982	8.993.900	N.D.	N.D.	N.D.	1.911.905	31
76	HC-Saturados	Eicosane	61,7	8.885.763	14.430.576	13.646.664	37.099.926	10.643.197	11.873.457	40.657.973	10.335.064	154

Tabla 36. Resultados de muestra de polen FRAXINIUS

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA, u.a.								Concentración media, ppm
				Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.935.168	37
2	Derivados de benceno	Tolueno	30,5	N.D.	N.D.	N.D.	171.020	3.080.839	N.D.	N.D.	N.D.	6
3	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	131.056	N.D.	N.D.	N.D.	2.525.304	10
4	Alcoholes	2,3-Butanediol, [R-(R*),R*]-	35,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21.848	0,2
5	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	226.726	867.914	N.D.	N.D.	542.904	3
6	Cetonas	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	37,4	N.D.	N.D.	81.961	508.429	631.427	N.D.	N.D.	3.843.092	8
7	Alcoholes	1-Hexanol	37,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.338.827	17
8	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.174.022	N.D.	255.158	20
9	Derivados de benceno	Benzene, (1-methylethyl)-	39,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	294.515	2
10	HC-Saturados	Hexane	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.000.377	7
11	Heterociclos aromáticos de Oxígeno	Furan, 2-pentyl-	41,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	106.318	1
12	HC-Saturados	Heptane, 3,3,5-trimethyl-	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	294.920	2
13	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.141.242	N.D.	N.D.	N.D.	5
14	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	137.502	N.D.	N.D.	161.211	412.946	1.757.122	5
15	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.011.833	541.533	N.D.	N.D.	N.D.	4

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
16	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	801.083	6
17	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	6.056.544	N.D.	N.D.	1.255.559	2.574.008	N.D.	37
18	HC-Saturados	Decane, 3-methyl-	43,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	830.524	6
19	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.048.302	N.D.	N.D.	18
20	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.492.899	N.D.	N.D.	43
21	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	129.521	227.580	N.D.	N.D.	104.284	N.D.	1
22	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	516.846	1.978.796	3.894.572	N.D.	217.731	14.928.542	28
23	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	382.042	12.338.647	1.541.787	1.521.457	6.428.211	2.757.229	18
24	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	175.114	N.D.	N.D.	N.D.	1
25	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	214.620	777.271	336.367	2.950.111	2.662.061	7
26	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	672.297	5
27	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	84.586	N.D.	N.D.	223.765	1
28	HC-Saturados	Heptane	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.635.905	N.D.	N.D.	6.161.746	26
29	Alcoholes	Ethanol, 1-(2-butoxyethoxy)-	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	1.086.576	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
30	Aldehídos	Decanal	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.700.419	13
31	Cetonas	Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	49,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	755.709	6
32	Cetonas	2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	49,9	N.D.	100.801	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
33	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	50,0	446.547	N.D.	1.583.506	9.586.980	2.133.003	12.248.595	11.603.006	N.D.	50
34	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.700.419	13
35	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.141.861	8
36	HC-Saturados	Undecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	800.237	N.D.	N.D.	3.028.427	13
37	Alcoholes	1-Dodecanol	50,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	364.308	N.D.	1
38	Alcoholes	1-Decanol	50,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.223.913	16
39	HC-Saturados	Cyclopropane, 1-ethyl-2-heptyl-	50,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.196.830	N.D.	N.D.	N.D.	5
40	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	669.891	N.D.	3.065.197	N.D.	N.D.	27
41	Alcoholes	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane-1,17-diol	51,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.288.865	N.D.	N.D.	91
42	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	19.485.402	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	268
43	HC-Saturados	Tridecane	53,1	N.D.	440.590	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.817.984	N.D.	10
44	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.200.707	9
45	Ésteres	Phthalic acid, hexyl undecyl ester	53,7	2.545.734	N.D.	3.965.070	852.478	2.516.113	3.100.446	1.445.324	1.407.768	23
46	HC-Saturados	Cyclododecane	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	807.438	N.D.	2

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA, u.a.								Concentración media, ppm
				Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
47	HC-Insaturados	1-Tridecene	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	635.442	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
48	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	1.926.277	N.D.	N.D.	2.589.740	N.D.	N.D.	35
49	HC-Insaturados	(+)-Epi-bicyclosquiphellandrene	54,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.095.468	N.D.	N.D.	N.D.	4
50	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	1.156.347	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16
51	HC-Insaturados	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)]-	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	948.427	7
52	HC-Insaturados	Epizonarene	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	552.188	N.D.	N.D.	N.D.	2
53	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	N.D.	N.D.	N.D.	152.784	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
54	Derivados de benceno	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	56,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	496.625	N.D.	N.D.	1.891.450	8
55	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.118.008	N.D.	N.D.	70
56	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	1.190.003	426.296	800.909	243.071	622.947	400.113	5

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	
57	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	400.763	N.D.	841.107	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8
58	HC-Saturados	Nonadecane	61,7	N.D.	205.176	319.697	1.395.376	N.D.	1.311.395	2.248.659	N.D.	8

Tabla 37. Resultados muestras de polen OLIVO

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.259.101	9
2	Ácidos Carboxílicos	Acetic Acid	23,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.677.976	27
3	Derivados de benceno	Toluene	30,4	425.807	N.D.	N.D.	881.098	3.208.437	N.D.	N.D.	N.D.	7
4	HC-Insaturados	1-Octene	30,7	N.D.	N.D.	N.D.	268.142	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
5	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	510.172	N.D.	N.D.	N.D.	959.899	4
6	Derivados de benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	17.354	0,1
7	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	486.878	N.D.	N.D.	172.721	2
8	Cetonas	Ethanone, 1-(2-methyl-2-cyclopenten-1-yl)-	37,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	574.313	4
9	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	350.650	3
10	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	N.D.	989.592	N.D.	368.377	N.D.	9.985.476	28
11	Aldehídos	Heptanal	38,7	N.D.	N.D.	N.D.	2.443.448	263.071	N.D.	N.D.	N.D.	4
12	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.270.544	N.D.	N.D.	N.D.	5
13	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	600.979	1.451.024	735.714	70.207	876.426	15.311.450	22
14	Cetonas	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	42,4	N.D.	N.D.	N.D.	720.819	238.984	N.D.	N.D.	4.974.517	13
15	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	1.030.180	537.316	N.D.	150.739	4.873.999	10

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
16	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	6.027.175	N.D.	N.D.	1.082.847	2.922.152	18.649.758	62
17	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	43,7	N.D.	N.D.	7.953.160	2.376.359	N.D.	653.785	2.010.216	N.D.	33
18	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	397.489	N.D.	N.D.	7
19	Alcoholes	1-Hexanol, 2-ethyl-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	581.916	N.D.	N.D.	N.D.	2
20	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.168.216	N.D.	N.D.	20
21	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	34.917	N.D.	N.D.	N.D.	56.501	N.D.	0,3
22	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	520.459	N.D.	N.D.	908.590	4
23	Ésteres	Octyl chloroformate	45,5	N.D.	N.D.	45.703	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
24	Alcoholes	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	515.313	3.661.180	920.716	1.449.577	1.689.915	4.521.639	14
25	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	612.636	N.D.	N.D.	N.D.	2
26	Aldehídos	Nonanal	46,5	1.853.131	N.D.	2.538.906	16.752.251	8.710.457	310.673	3.176.516	73.252.992	99
27	Derivados de benceno	Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	46,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	138.246	N.D.	N.D.	N.D.	1
28	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	661.671	N.D.	N.D.	N.D.	3
29	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	320.041	2
30	Cetonas	6-Methyl-3,5-heptadiene-2-one	47,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	464.911	3
31	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	97.162	N.D.	315.436	N.D.	N.D.	431.693	2
32	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	499.467	4

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
33	Ésteres	Nonanoic acid, methyl ester	49,2	289.293	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
34	Aldehídos	Decanal	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.525.237	41
35	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 1-methyl	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	804.812	6
36	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl-	49,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	177.830	N.D.	109.885	2
37	Aminas	Morpholine, 4-octadecyl-	49,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.272.227	N.D.	3
38	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	50,0	81.974	N.D.	296.127	N.D.	462.578	N.D.	N.D.	N.D.	2
39	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	644.140	5
40	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	838.379	6
41	HC-Saturados	Dodecane	50,2	1.065.052	N.D.	222.772	N.D.	700.174	N.D.	N.D.	22.004.442	45
42	Alcoholes	Ethanol, 2-phenoxy-	50,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	140.319	N.D.	N.D.	2
43	Ácidos Carboxílicos	Nonanoic acid	51,1	N.D.	N.D.	N.D.	19.297.190	N.D.	N.D.	13.190.380	N.D.	43
44	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.420.241	N.D.	N.D.	24
45	Aldehídos	Undecanal	51,4	N.D.	N.D.	N.D.	2.253.133	N.D.	N.D.	N.D.	2.512.023	12
46	Alcoholes	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane-1,17-diol	51,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.836.201	N.D.	N.D.	83

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
47	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 2-methyl	52,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	181.851	1
48	Éteres	trans-2,3-Epoxydecane	52,6	N.D.	N.D.	N.D.	3.535.115	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
49	Isocianato	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	6.408.107	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	88
50	HC-Saturados	Tridecane	53,3	239.203	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	891.692	3.429.550	10
51	Aldehídos	Dodecanal	53,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	512.740	N.D.	1
52	Aldehídos	Tridecanal	53,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.857.239	14
53	Ésteres	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	53,7	1.291.363	N.D.	4.042.173	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	35
54	Ésteres	Phthalic acid, isobutyl undecyl ester	53,7	N.D.	N.D.	N.D.	2.061.173	N.D.	1.091.528	2.038.019	N.D.	10
55	Cetonas	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-(2-pentenyl)-, (Z)-	54,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.113.406	23
56	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	N.D.	N.D.	N.D.	1.590.645	283.448	N.D.	5.576.888	N.D.	7
57	Cetonas	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-(2-pentenyl)-, (Z)-	54,1	382.434	N.D.	1.361.562	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.532.045	19
58	Cetonas	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	54,3	7.120.482	N.D.	9.198.070	11.050.364	N.D.	N.D.	5.788.333	57.545.889	135

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.									
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm	
59	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	1.701.721	N.D.	N.D.	1.511.300	N.D.	N.D.	25	
60	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	2.466.564	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	34	
61	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-4-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.637.001	N.D.	N.D.	28	
62	Aldehídos	Tetradecanal	55,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.092.904	30	
63	Aldehídos	Tridecanal	55,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.002.255	N.D.	3	
64	Aldehídos	17-Octadecenal	55,4	N.D.	N.D.	N.D.	3.295.214	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9	
65	HC-Insaturados	7-Hexadecene, (Z)-	55,8	N.D.	N.D.	N.D.	756.454	N.D.	N.D.	N.D.	1.613.435	7	
66	HC-Saturados	Tetradecane	55,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.096.695	N.D.	16	
67	Cetonas	3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	55,8	N.D.	N.D.	269.411	554.399	N.D.	N.D.	N.D.	1.727.437	6	
68	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	N.D.	N.D.	N.D.	1.300.097	N.D.	N.D.	N.D.	1.295.940	7	
69	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.761.759	N.D.	N.D.	30	
70	Éteres	Oxirane, hexadecyl-	57,7	2.622.983	N.D.	1.732.572	11.255.521	5.977.159	N.D.	7.707.322	10.711.215	34	
71	HC-Insaturados	8-Heptadecene	58,1	26.542.399	N.D.	12.093.454	82.821.910	N.D.	N.D.	39.664.772	79.056.935	275	
72	HC-Saturados	Heptadecane	58,4	6.701.977	N.D.	2.706.433	22.963.953	N.D.	N.D.	10.289.085	20.712.429	71	
73	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	N.D.	N.D.	N.D.	823.163	1.206.461	181.989	N.D.	653.152	4	
74	Derivados de benceno	Diethyltoluamide	59,0	N.D.	N.D.	N.D.	386.204	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
75	Ésteres	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	60,0	N.D.	N.D.	1.669.753	3.228.750	N.D.	N.D.	2.032.493	2.655.506	14
76	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	322.633	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	841.782	5
77	Aldehídos	Octadecanal	60,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.211.714	4.157.666	24
78	Éteres	Oxirane, heptadecyl-	60,6	N.D.	N.D.	N.D.	5.597.173	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
79	Aldehídos	Hexadecanal	60,6	1.837.714	N.D.	1.574.394	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21
80	Cetonas	1,4,7,10,13,16,19-Heptaoxa-2-cycloheneicosanone	61,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.454.517	N.D.	N.D.	25
81	HC-Saturados	Nonadecane	61,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.161.537	N.D.	N.D.	1.269.487	N.D.	5
82	HC-Saturados	Eicosane	61,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.887.107	N.D.	8
83	HC-Saturados	Tridecane, 7-propyl-Nonadecane	61,8	N.D.	499.168	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14
84	HC-Saturados	dodecosane	62,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.563.729	N.D.	N.D.	6.340.059	N.D.	10

Tabla 38. Resultados muestras polen POPULUS

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
				Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	635.833	5
2	Ácidos Carboxílicos	Acetic Acid	23,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.154.531	53
3	Ácidos Carboxílicos	Propanoic acid	30,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.299.174	17
4	Derivados de benceno	Tolueno	30,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	624.824	N.D.	N.D.	N.D.	2
5	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	620.204	N.D.	N.D.	N.D.	4.241.016	17
6	Derivados de benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	50.217	N.D.	N.D.	150.251	1
7	Cetonas	Ethanone, 1-(2-methyl-2-cyclopenten-1-yl)-	37,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.803	N.D.	N.D.	100.395	0,4
8	Aldehídos	2-Hexenal, (E)-	37,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	361.857	3
9	Organosulfurados	Dimethyl Sulfoxide	38,6	N.D.	N.D.	1.604.839	12.701.729	1.627.602	6.388.722	1.956.512	26.855.156	63
10	Heterociclos aromáticos de Oxígeno	Furan, 2-pentyl-	41,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	361.417	3
11	HC-Insaturados	Cyclohexene, 1-butyl-	41,5	N.D.	N.D.	N.D.	132.014	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
12	Alcoholes	1-Octen-3-ol	42,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	917.550	7
13	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	599.427	N.D.	N.D.	192.370	1.699.328	N.D.	5
14	Derivados de benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.969.389	1.728.868	N.D.	N.D.	23.173.760	62
15	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	95.636	N.D.	N.D.	633.506	3

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
16	Ácidos Carboxílicos	Hexanoic acid	43,2	N.D.	N.D.	736.071	4.973.055	2.163.372	N.D.	243.471	1.309.836	9
17	Organosulfurados	Dimethyl sulfone	43,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	401.726	491.757	2
18	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	19.693.953	N.D.	N.D.	1.485.312	7.798.479	924.366	81
19	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	43,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	211.638	2
20	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-oxybis-	43,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.113.136	N.D.	N.D.	36
21	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.874.121	N.D.	N.D.	49
22	Cetonas	3-Octen-2-one	44,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	555.359	4
23	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	76.729	N.D.	N.D.	N.D.	94.524	N.D.	1
24	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	331.594	N.D.	N.D.	785.367	4
25	Derivados de benceno	Benzyl Alcohol	45,7	204.879	N.D.	5.738.490	16.067.137	9.991.366	4.675.065	7.337.842	48.303.573	89
26	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	46,0	N.D.	N.D.	159.975	N.D.	110.814	N.D.	N.D.	3.839.799	10
27	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	379.252	627.272	N.D.	65.501	2.350.085	5
28	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	3-Aminopyrazole	46,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	503.669	N.D.	N.D.	N.D.	2
29	Cetonas	3,5-Octadien-2-one, (E,S)-	46,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	553.746	N.D.	N.D.	1.603.866	7
30	Ésteres	2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-	47,2	N.D.	N.D.	142.214	N.D.	390.887	N.D.	N.D.	1.064.222	4

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
31	Cetonas	6-Methyl-3,5-heptadiene-2-one	47,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	341.966	3
32	Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	48,0	N.D.	N.D.	89.748	N.D.	187.403	N.D.	N.D.	748.259	3
33	Alcoholes	1-nonanol	48,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	257.353	N.D.	N.D.	N.D.	1
34	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	207.201	N.D.	N.D.	N.D.	1
35	Amidas	2-Pyrrolidinone	48,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	208.367	N.D.	N.D.	1.157.070	5
36	Ésteres	Undecanoic acid propyl ester, 10-hydroxy-11-morpholin-4-yl-	49,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.035.116	N.D.	N.D.	103
37	Aminas	Morpholine, 4-octadecyl-	49,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	65.718.991	N.D.	173
38	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.976.712	15
39	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.546.885	26
40	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.286.625	N.D.	N.D.	90
41	Alcoholes	3,6,9,12,15-Pentaohaheptadecane-1,17-diol	51,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.954.873	N.D.	N.D.	33
42	Aromáticos polinucleares	Naphthalene, 1-methyl	52,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	119.725	1
43	Fenol derivados	2-Methoxy-4-vinylphenol	52,5	N.D.	N.D.	N.D.	486.450	680.024	N.D.	1.112.130	N.D.	2
44	Alcoholes	2-Butyl-2,7-octadien-1-ol	52,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.243.973	17

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
45	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	31.669.657	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	436
46	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.164.828	9
47	Ésteres	Phthalic acid, isobutyl undecyl ester	53,7	N.D.	N.D.	N.D.	534.452	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
48	Ésteres	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	54,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	972.189	N.D.	N.D.	1.397.331	7
49	Cetonas	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	54,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.481.642	N.D.	N.D.	3.712.773	17
50	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	3.855.061	N.D.	N.D.	3.028.251	N.D.	N.D.	52
51	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	7.429.018	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	102
52	Fenol derivados	Vanillin	55,2	N.D.	N.D.	5.609.655	3.727.548	350.129	9.781.406	N.D.	1.107.221	53
53	Derivados de benceno	Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.083.478	3.529.686	8.020.655	N.D.	35
54	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-6-methyl-	55,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.302.990	N.D.	N.D.	39
55	HC-Saturados	Pentadecane	55,9	N.D.	318.782	N.D.	908.137	N.D.	N.D.	5.706.142	N.D.	9

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN LA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
56	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanediyl oxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.984.324	N.D.	N.D.	137
57	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	57,7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	531.532	N.D.	N.D.	1.154.294	5
58	HC-Saturados	Heptadecane	58,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	249.215	N.D.	N.D.	N.D.	1
59	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	208.265	N.D.	1.060.250	N.D.	187.404	612.757	N.D.	1.137.745	7
60	Ésteres	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	60,0	N.D.	N.D.	651.768	N.D.	631.685	N.D.	N.D.	644.874	5
61	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.310.026	10

Tabla 39. Resultados muestras de polen ARIZÓNICA

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								Concentración media, ppm
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde-Amarilla	Azul clara	
1	Cetonas	Acetona	9,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.935.168	37
2	Derivados del benceno	Toluene	30,4	N.D.	N.D.	536.265	157.540	3.080.839	N.D.	N.D.	531.001	6
3	Aldehídos	Hexanal	33,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.525.304	19
4	Derivados del benceno	Ethylbenzene	36,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	223.556	N.D.	N.D.	76.592	1
5	Derivados del benceno	p-Xylene	36,5	N.D.	N.D.	47.548	183.233	867.914	N.D.	N.D.	560.802	2
6	Cetonas	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	37,4	N.D.	N.D.	81.961	508.938	603.800	N.D.	N.D.	3.843.092	8
7	Alcoholes	1-Hexanol	37,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.338.827	17
8	HC-Saturados	Hexane	41,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.000.377	7
9	HC-Saturados	Heptane, 2,5,5-trimethyl-	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	317.823	2
10	Cetonas	4-Hexen-3-one	41,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.141.242	N.D.	N.D.	N.D.	5
11	Ésteres	Butyrolactone	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	63.536	398.015	N.D.	1
12	Derivados del benceno	Benzaldehyde	42,3	N.D.	N.D.	N.D.	2.011.833	N.D.	N.D.	N.D.	2.000.480	10
13	Aldehídos	Octanal	42,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	251.580	2
14	HC-Insaturados	Limonene	43,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	545.735	4
15	Derivados del benceno	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	43,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.035.819	8
16	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	43,5	N.D.	N.D.	6.056.544	N.D.	N.D.	776.948	2.573.346	666.641	27

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
17	Aminas	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso-	44,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.400.971	N.D.	N.D.	24
18	Fenol derivados	Phenol	44,9	N.D.	N.D.	129.521	232.789	N.D.	86.298	112.747	126.811	1
19	Alcoholes	1-Heptanol	45,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	119.818	234.298	N.D.	1
20	Alcoholes	1-Octanol	45,5	N.D.	N.D.	516.846	1.978.796	3.894.572	N.D.	N.D.	14.928.542	35
21	Derivados del benceno	Benzyl Alcohol	45,7	N.D.	N.D.	382.042	12.338.647	1.541.787	2.661.216	6.622.151	2.757.229	21
22	Derivados del benceno	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	45,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	186.405	1
23	Derivados del benceno	Acetophenone	46,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	159.268	1
24	HC-Saturados	Naphthalene, decahydro-2-methyl-	46,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	401.774	3
25	Aldehídos	Nonanal	46,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	777.271	N.D.	82.973	2.662.061	8
26	HC-Saturados	Heptane	47,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.635.905	N.D.	N.D.	672.297	6
27	Aldehídos	2-Nonenal, (E)-	48,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	117.437	N.D.	N.D.	N.D.	0,5
28	Alcoholes	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	49,2	N.D.	N.D.	N.D.	1.086.576	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
29	Cetonas	Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	49,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	755.709	6
30	Cetonas	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	49,9	510.359	N.D.	289.036	9.586.980	2.133.003	3.830.951	11.603.006	N.D.	23
31	Alcoholes	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	50,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.700.419	13
32	Alcoholes	1-Propanol, 2-(2-hydroxypropoxy)-	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.141.861	8

ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.

Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
33	HC-Saturados	Undecane	50,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.028.427	22
34	HC-Saturados	Dodecane	50,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	800.237	N.D.	N.D.	N.D.	3
35	Alcoholes	1-Dodecanol	50,7	N.D.	N.D.	215.092	669.891	1.196.830	N.D.	N.D.	2.223.913	7
36	Alcoholes	Triethylene glycol	51,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	798.672	N.D.	N.D.	14
37	Isocianatos	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	53,1	N.D.	N.D.	1.799.903	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	25
38	HC-Saturados	Tridecane	53,3	N.D.	401.252	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.817.984	N.D.	9
39	Ésteres	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	53,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	340.284	3
40	Ésteres	Phthalic acid, hexyl undecyl ester	53,7	2.545.734	N.D.	2.383.024	979.992	2.516.113	1.223.670	1.286.735	988.127	15
41	HC-Insaturados	1-Tetradecene	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	587.310	N.D.	2
42	Alcoholes	n-Tridecan-1-ol	54,5	N.D.	N.D.	N.D.	705.927	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
43	Heterociclos aromáticos de Nitrógeno	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	54,8	N.D.	N.D.	908.661	N.D.	N.D.	1.507.211	N.D.	N.D.	19
44	Organosulfurados	Benzo[b]thiophene, 6-methyl-	55,0	N.D.	N.D.	518.532	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
45	HC-Insaturados	Isodene	55,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.043.139	8
46	HC-Saturados	Pentadecane	55,9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.406.020	N.D.	N.D.	6.635.697	27
47	HC-Saturados	Hexadecane	56,0	N.D.	N.D.	N.D.	139.724	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,4
48	Derivados del benceno	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	56,0	174.182	N.D.	152.259	N.D.	496.625	N.D.	N.D.	1.988.042	5

				ÁREAS DE PICOS CROMATOGRÁFICOS EN CADA FIBRA SPME, u.a.								
Nº	Tipo de compuesto	Compuesto	tr, min	Roja	Verde	Blanca	Gris	Rosa	Violeta clara	Verde- Amarilla	Azul clara	Concentración media, ppm
49	Alcoholes	Ethanol, 2,2'-[oxybis(2,1-ethanedioxy)]bis-	57,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.050.914	N.D.	N.D.	18
50	Alcoholes	Pentaethylene glycol	57,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.603.208	N.D.	N.D.	27
51	Ésteres	Diethyl Phthalate	58,7	489.927	N.D.	637.717	N.D.	868.734	1.118.455	583.235	414.882	7
52	Ésteres	Phthalic acid, 2-ethoxyethyl butyl ester	59,7	N.D.	N.D.	911.382	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13
53	Ésteres	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	60,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	431.527	3
54	HC-Saturados	Eicosane	61,7	N.D.	N.D.	N.D.	1.408.089	N.D.	831.727	2.248.659	N.D.	8

7. ANEXO II: Cromatogramas TIC y espectros de masas obtenidos en el análisis de polen

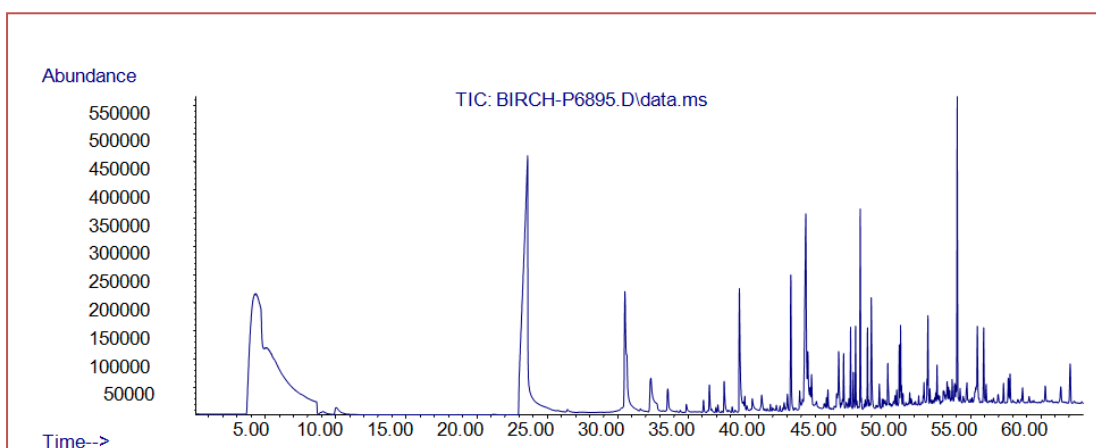
CROMATOGRAMAS

Cromatograma TIC 1. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra azul clara.....	317
Cromatograma TIC 2. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra violeta clara.....	317
Cromatograma TIC 3. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra roja.	318
Cromatograma TIC 4. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra azul clara.	318
Cromatograma TIC 5. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra violeta clara.....	319
Cromatograma TIC 6. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra roja.	319
Cromatograma TIC 7. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra azul clara.....	320
Cromatograma TIC 8. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra violeta clara. .	320
Cromatograma TIC 9. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra roja.....	321
Cromatograma TIC 10. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra azul clara.	321
Cromatograma TIC 11. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra violeta clara.	322
Cromatograma TIC 12. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra roja.	322
Cromatograma TIC 13. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra azul clara.	323
Cromatograma TIC 14. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra violeta clara. ...	323
Cromatograma TIC 15. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra roja.	324
Cromatograma TIC 16. Cromatograma TIC del polen POA, fibra azul clara.....	324
Cromatograma TIC 17. Cromatograma TIC del polen POA, fibra violeta clara.	325
Cromatograma TIC 18. Cromatograma TIC del polen POA, fibra roja.....	325
Cromatograma TIC 19. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra azul clara.	326
Cromatograma TIC 20. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra violeta clara. ..	326
Cromatograma TIC 21. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra roja.....	327
Cromatograma TIC 22. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra azul clara.	327
Cromatograma TIC 23. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra violeta clara. .	328
Cromatograma TIC 24. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra roja.	328
Cromatograma TIC 25. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra azul clara.....	329
Cromatograma TIC 26. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra violeta clara.	329
Cromatograma TIC 27. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra roja.	330
Cromatograma TIC 28. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra azul clara.	330
Cromatograma TIC 29. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra violeta clara. ...	331

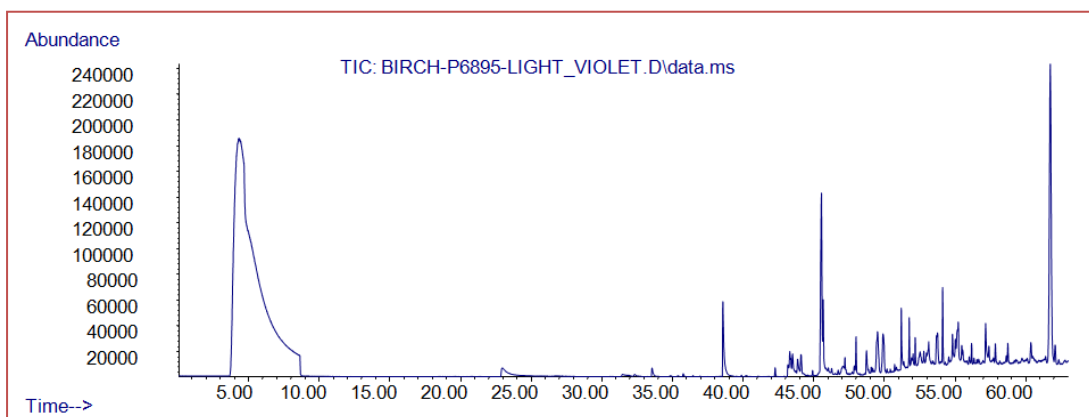
Cromatograma TIC 30. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra roja.	331
Cromatograma TIC 31. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra azul clara.	332
Cromatograma TIC 32. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra violeta clara.	332
Cromatograma TIC 33. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra roja.	333

ESPECTROS DE MASAS:

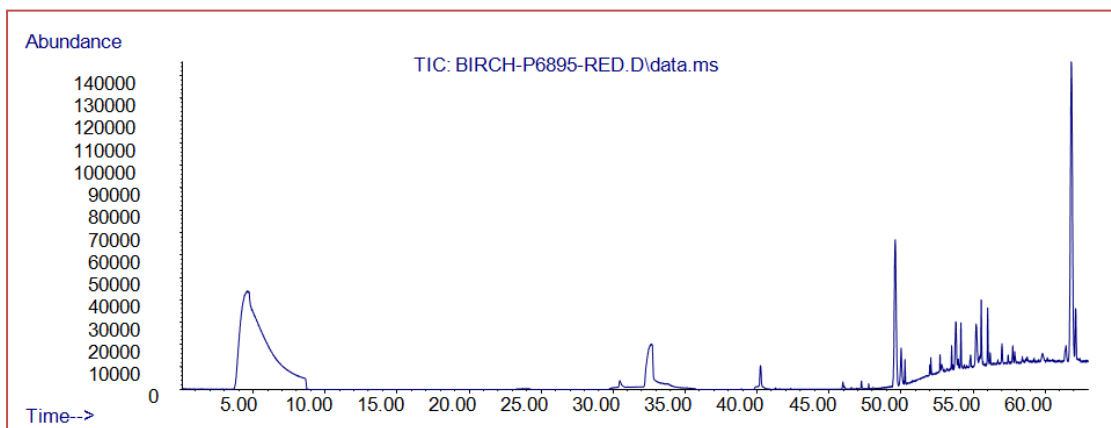
Espectro de masas 1. BIRCH, fibra azul clara, pico cromatográfico a 23,264 minutos, identificado como ácido acético.	334
Espectro de masas 2. GRASS, fibra gris, pico cromatográfico a 38,631 minutos identificado como dimetilsulfóxido.	334
Espectro de masas 3. HALAPENSE, fibra roja, pico cromatográfico a 32,648 minutos identificado como tetracloroetileno.	335
Espectro de masas 4. HALAPENSE, fibra azul clara, pico cromatográfico a 51.965 minutos identificado como 1-metil-naftaleno.	335
Espectro de masas 5. HALAPENSE, fibra azul clara, pico cromatográfico a 52.360 minutos identificado como 2-metil-naftaleno.	336
Espectro de masas 6. PLÁTANO, fibra verde-amarilla, pico cromatográfico a 52.742 minutos identificados como 1-metil-2(2-metilpropil)-hidracina.	336
Espectro de masas 7. POA, fibra blanca, pico cromatográfico a 53.051 minutos identificado como 1-metil, 2,4-diisocianato-benceno.	337
Espectro de masas 8. FRAXINIUS, fibra rosa, pico cromatográfico a 30.425 minutos identificado como tolueno.	337
Espectro de masas 9. FRAXINIUS, fibra roja, pico cromatográfico a 53.792 minutos identificado como isobutil-octil ftalato.	338
Espectro de masas 10. ARIZÓNICA, fibra verde, pico cromatográfico a 53.102 minutos identificado como tridecano.	338



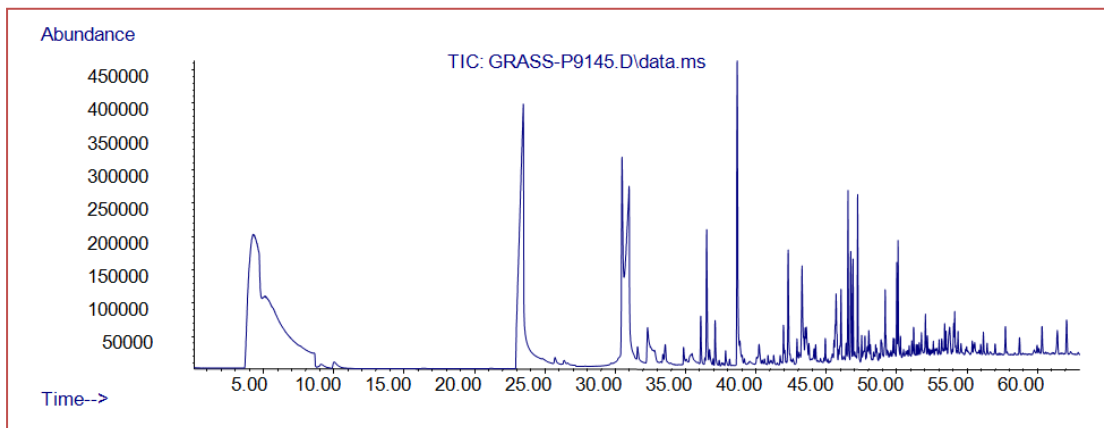
Cromatograma TIC 1. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra azul clara.



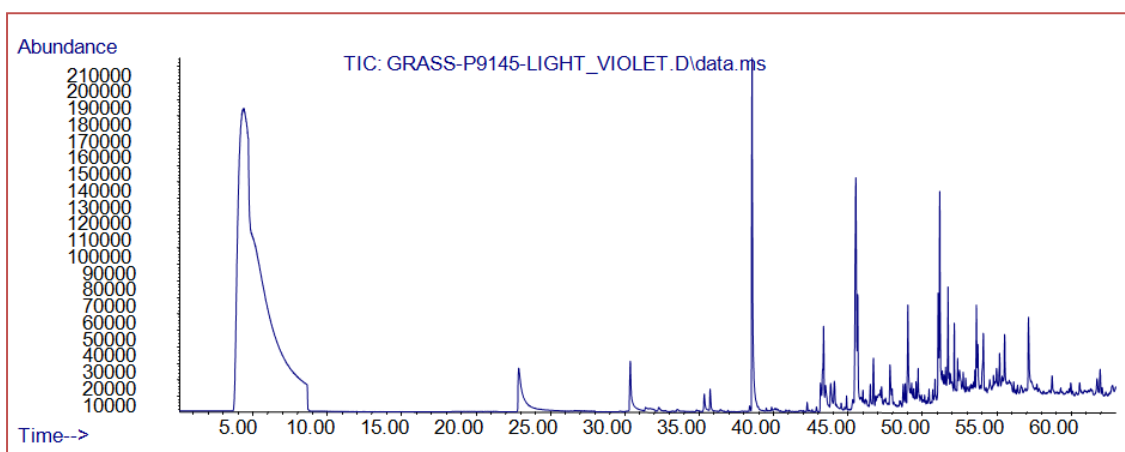
Cromatograma TIC 2. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra violeta clara



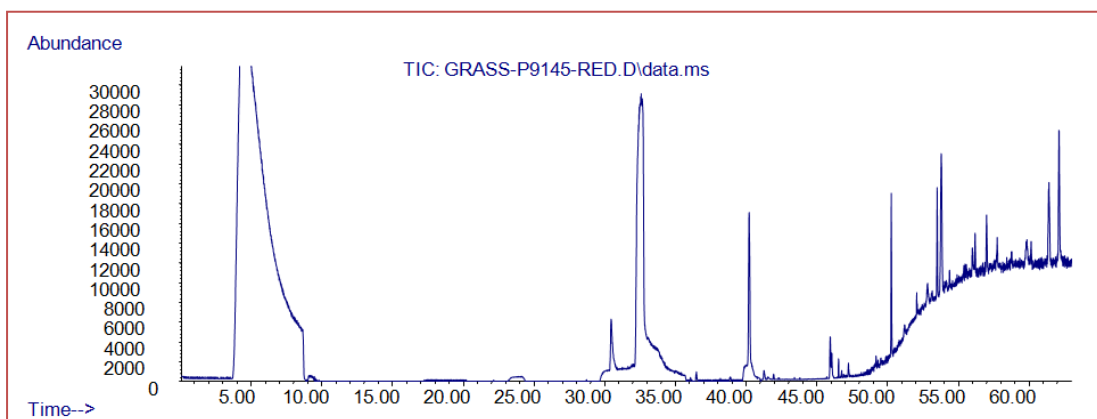
Cromatograma TIC 3. Cromatograma TIC del polen BIRCH, fibra roja.



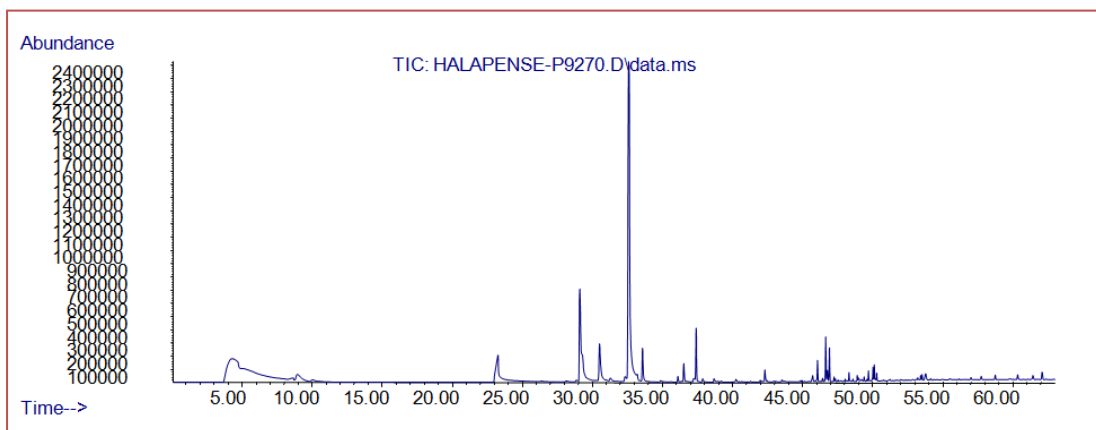
Cromatograma TIC 4. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra azul clara.



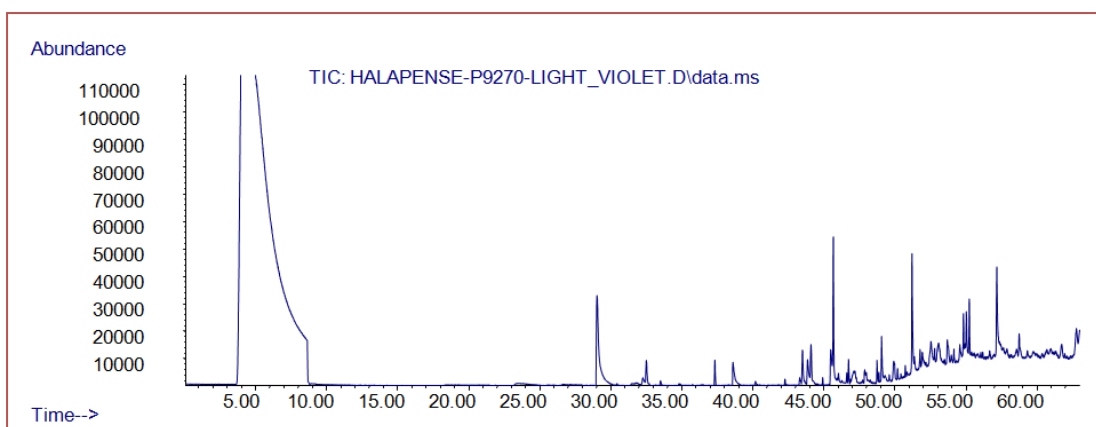
Cromatograma TIC 5. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra violeta clara.



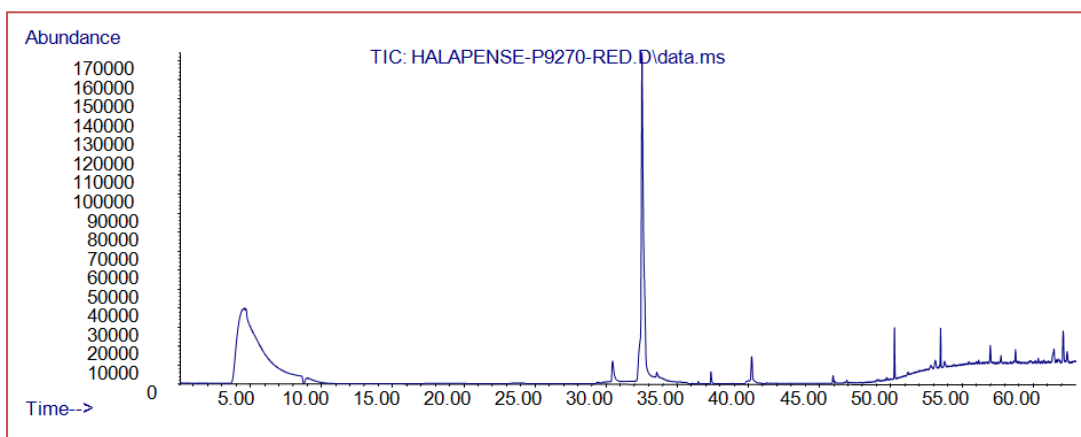
Cromatograma TIC 6. Cromatograma TIC del polen GRASS, fibra roja.



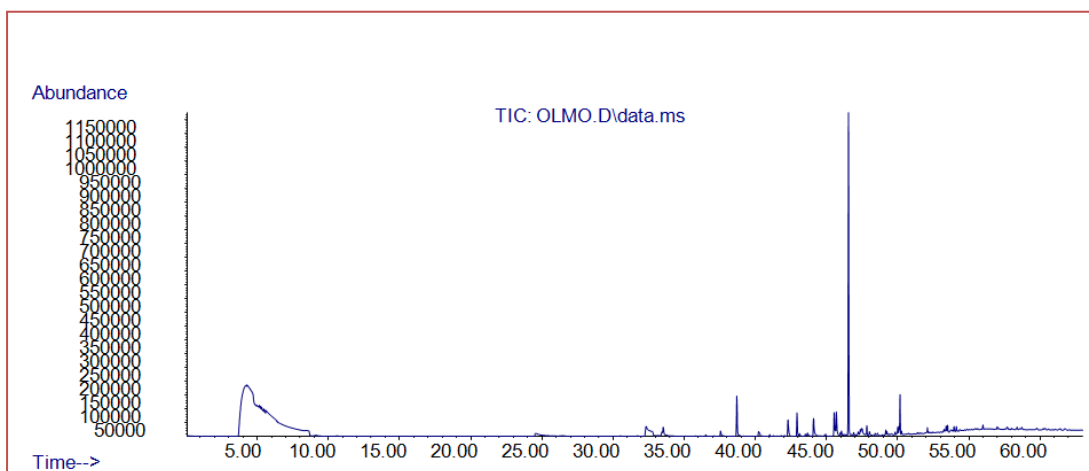
Cromatograma TIC 7. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra azul clara.



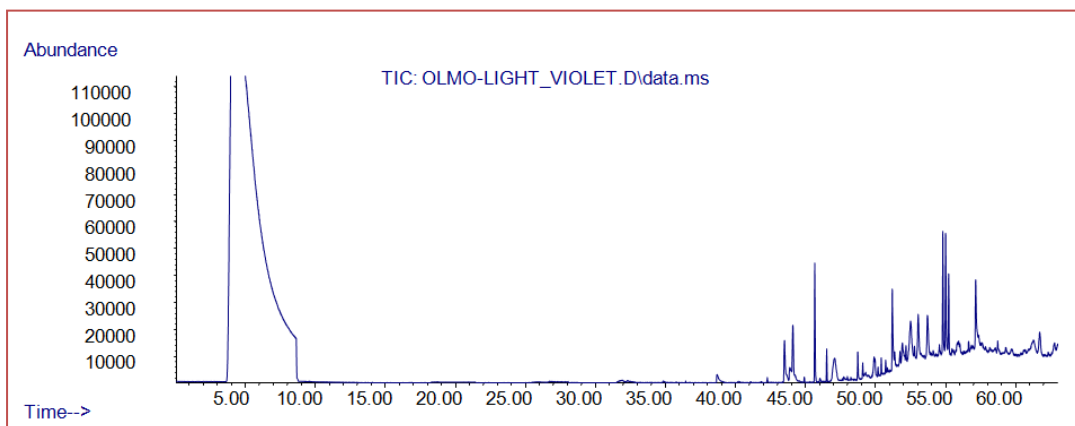
Cromatograma TIC 8. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra violeta clara.



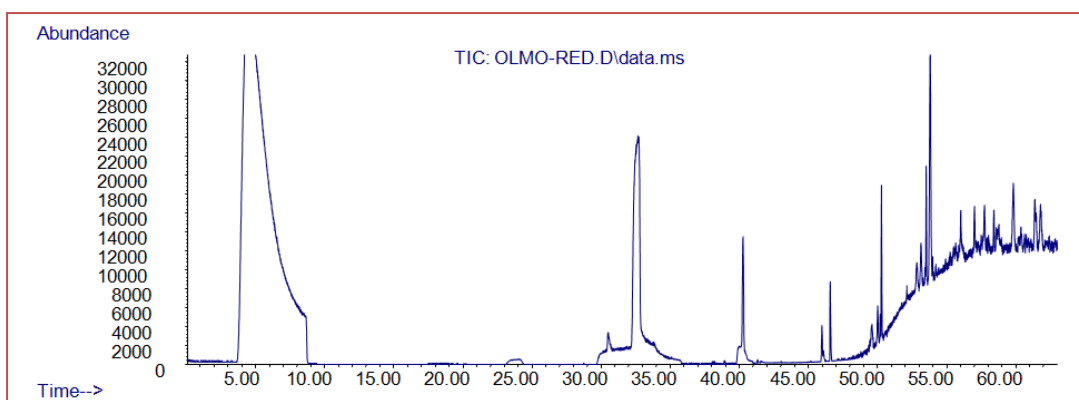
Cromatograma TIC 9. Cromatograma TIC del polen HALAPENSE, fibra roja.



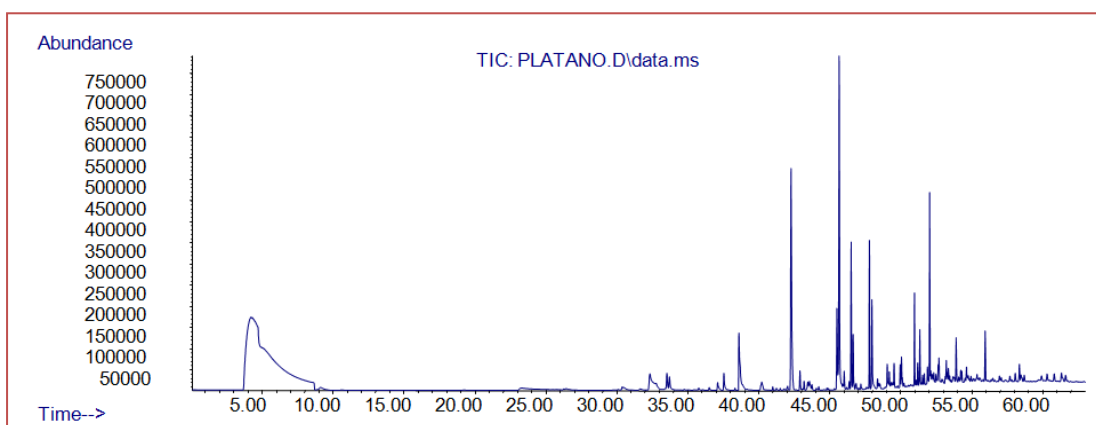
Cromatograma TIC 10. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra azul clara.



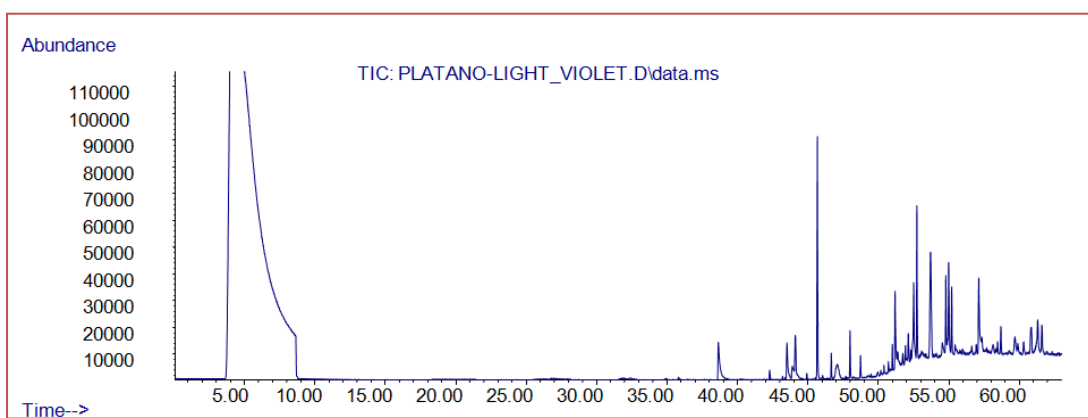
Cromatograma TIC 11. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra violeta clara.



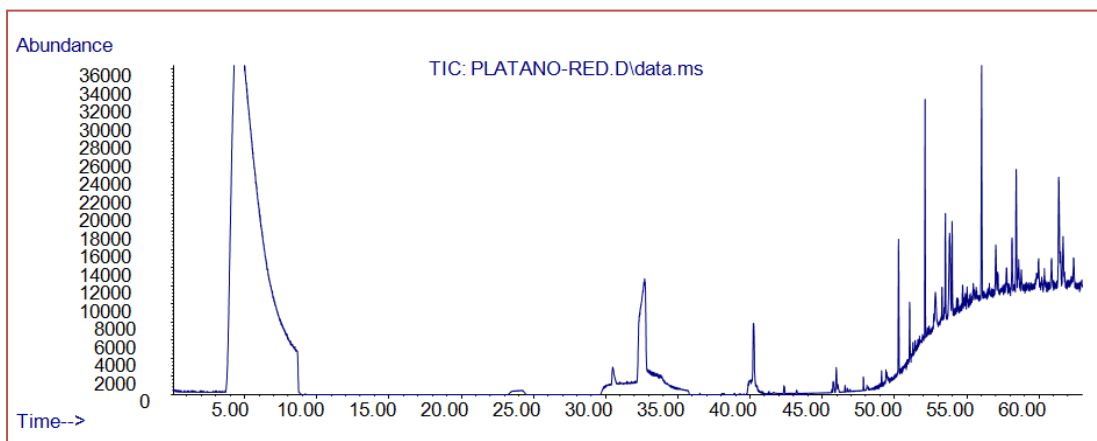
Cromatograma TIC 12. Cromatograma TIC del polen OLMO, fibra roja.



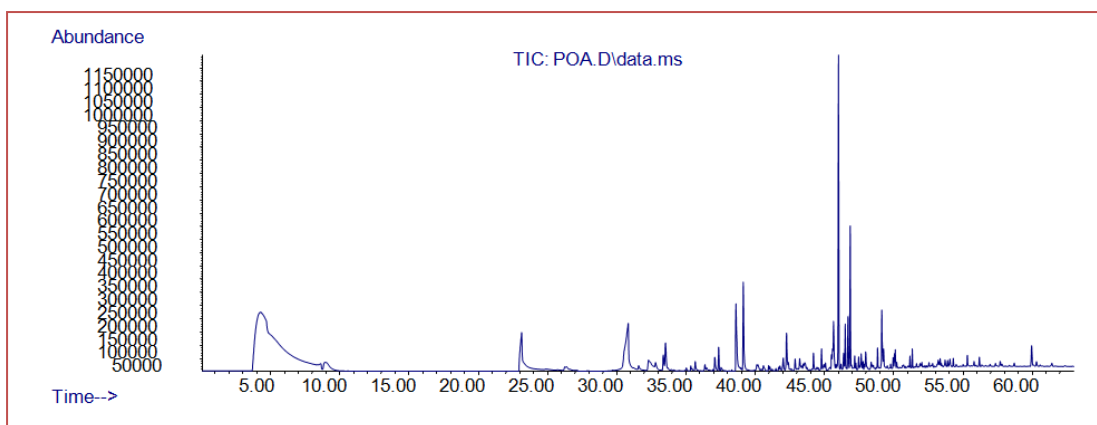
Cromatograma TIC 13. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra azul clara.



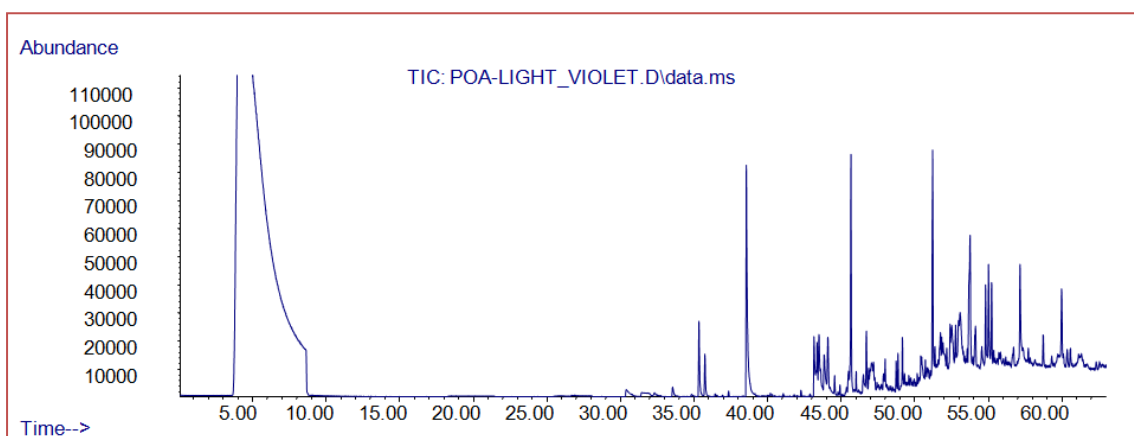
Cromatograma TIC 14. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra violeta clara.



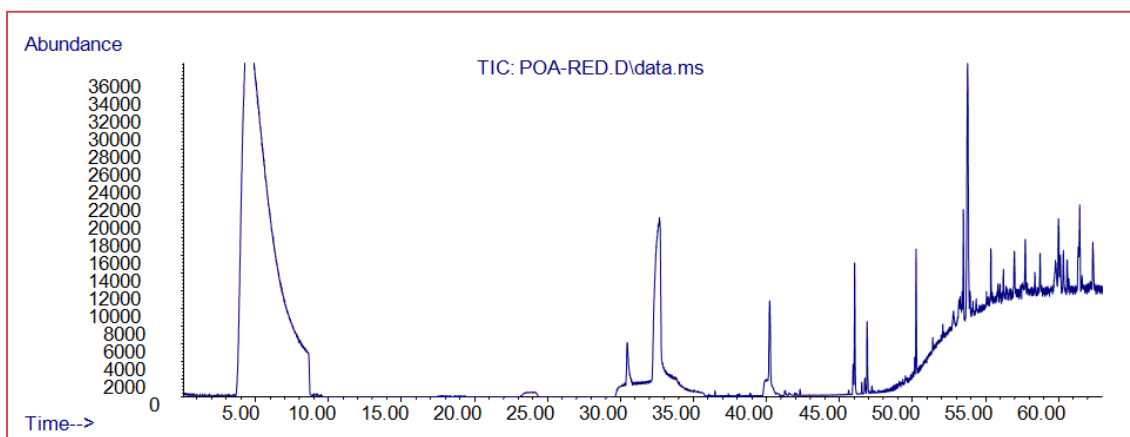
Cromatograma TIC 15. Cromatograma TIC del polen PLÁTANO, fibra roja.



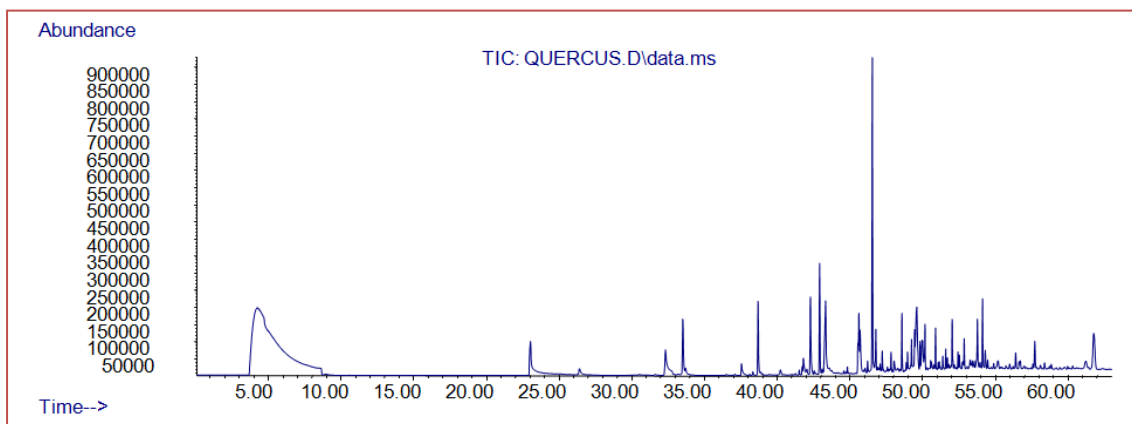
Cromatograma TIC 16. Cromatograma TIC del polen POA, fibra azul clara.



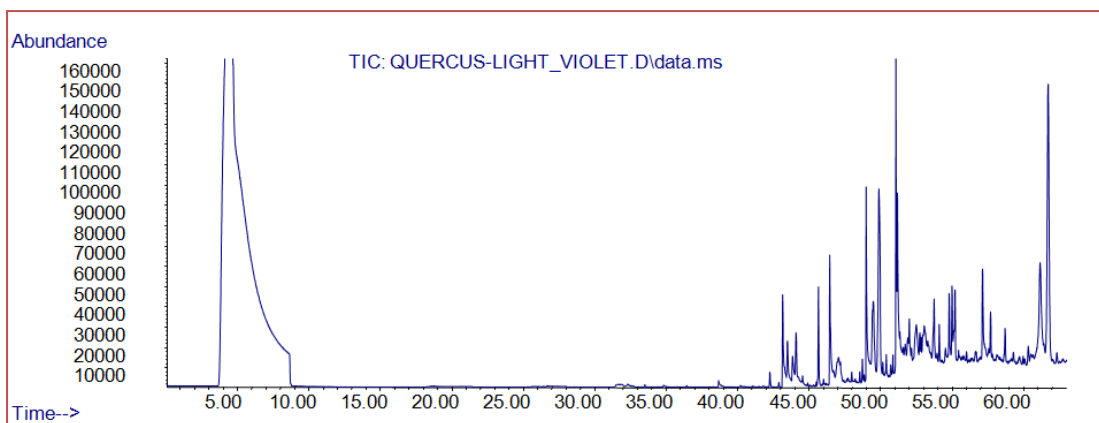
Cromatograma TIC 17. Cromatograma TIC del polen POA, fibra violeta clara.



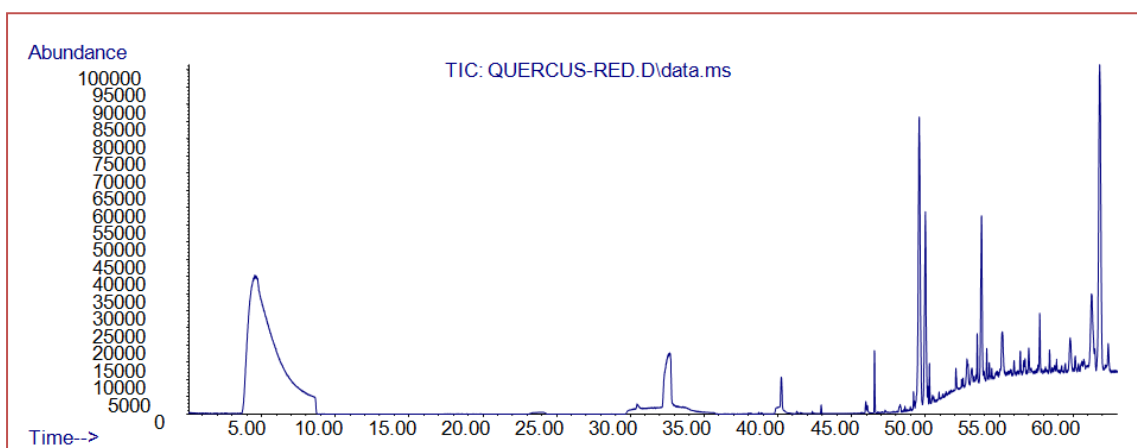
Cromatograma TIC 18. Cromatograma TIC del polen POA, fibra roja.



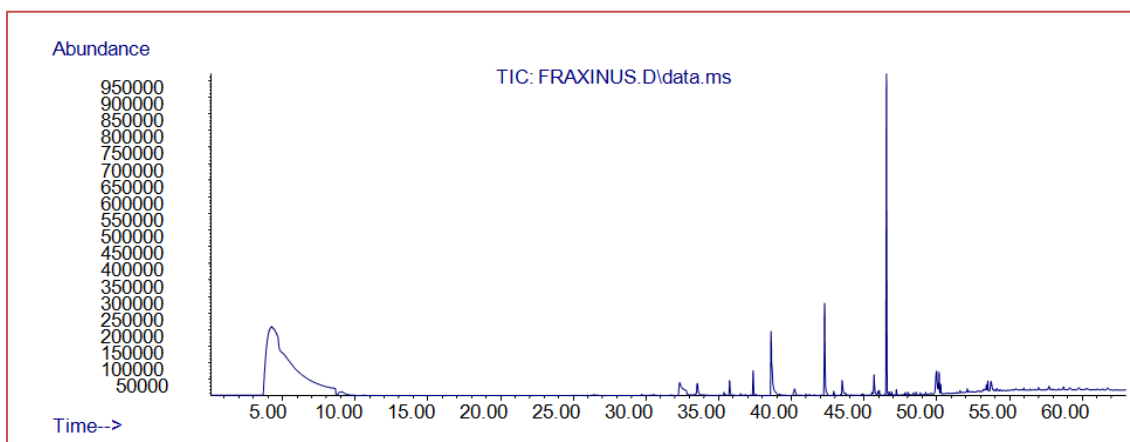
Cromatograma TIC 19. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra azul clara.



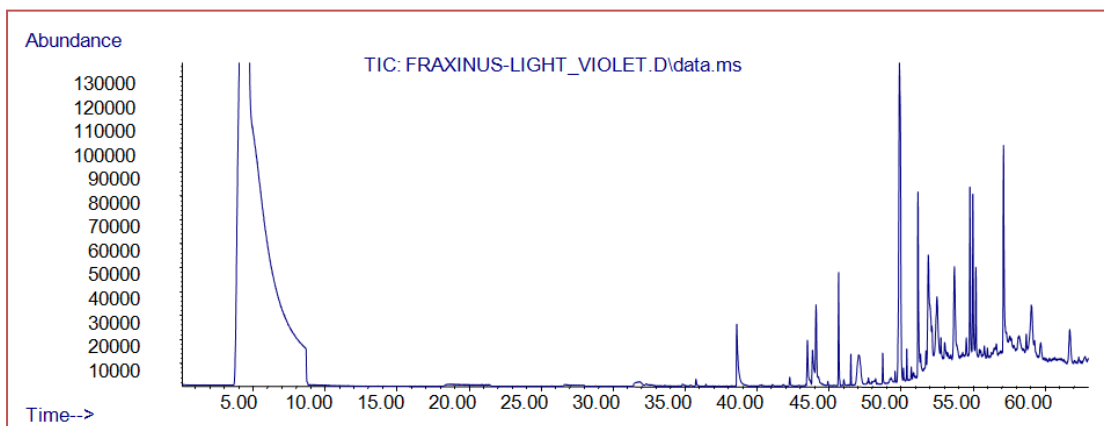
Cromatograma TIC 20. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra violeta clara.



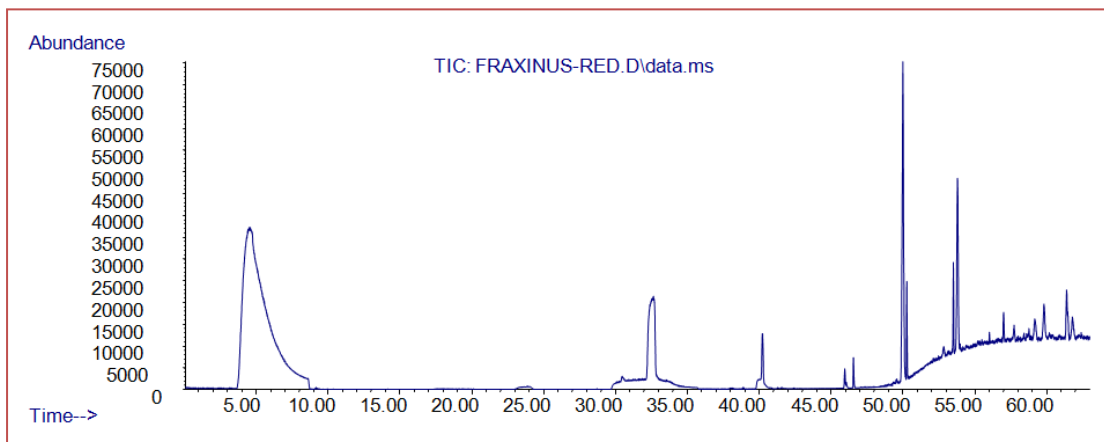
Cromatograma TIC 21. Cromatograma TIC del polen QUERCUS, fibra roja.



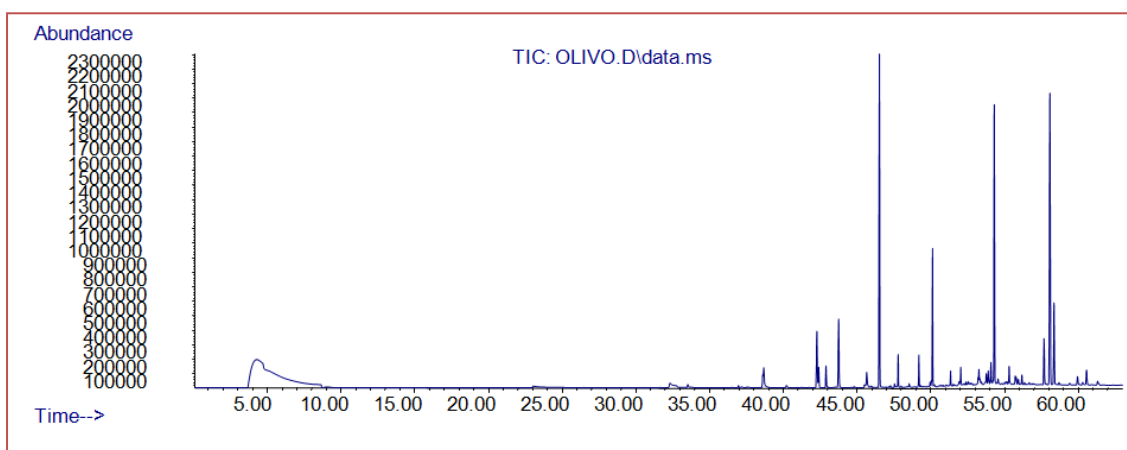
Cromatograma TIC 22. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra azul clara.



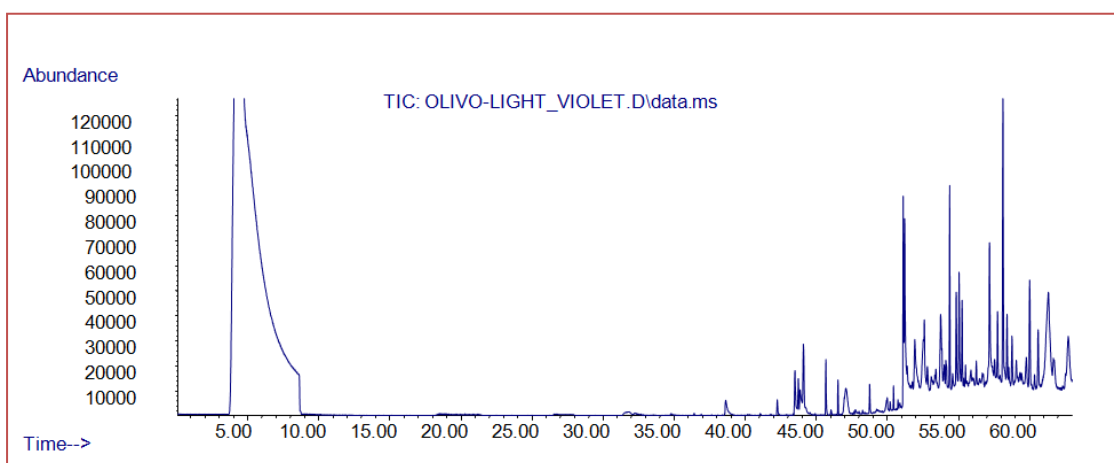
Cromatograma TIC 23. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra violeta clara.



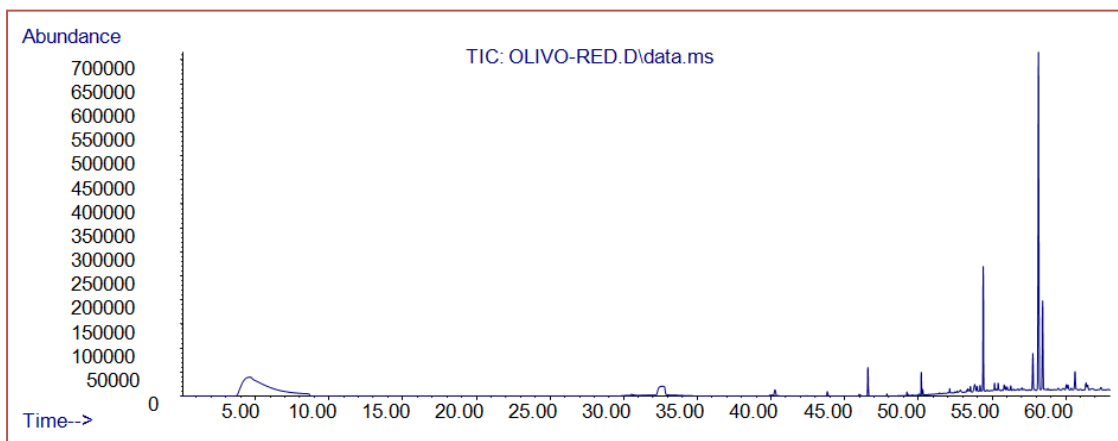
Cromatograma TIC 24. Cromatograma TIC del polen FRAXINIUS, fibra roja.



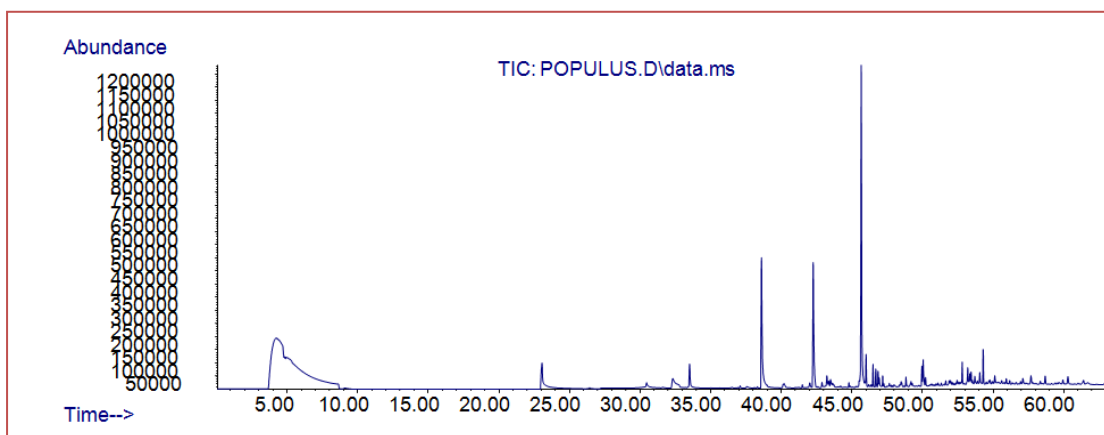
Cromatograma TIC 25. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra azul clara.



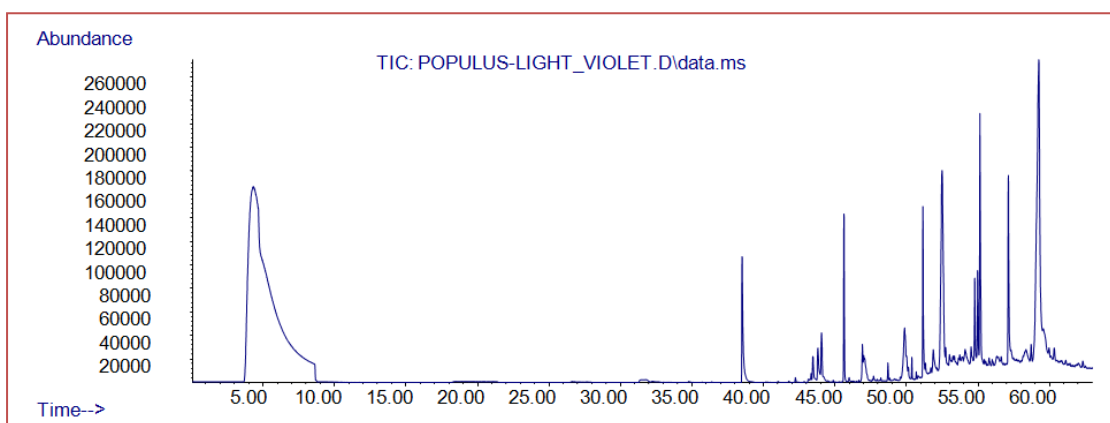
Cromatograma TIC 26. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra violeta clara.



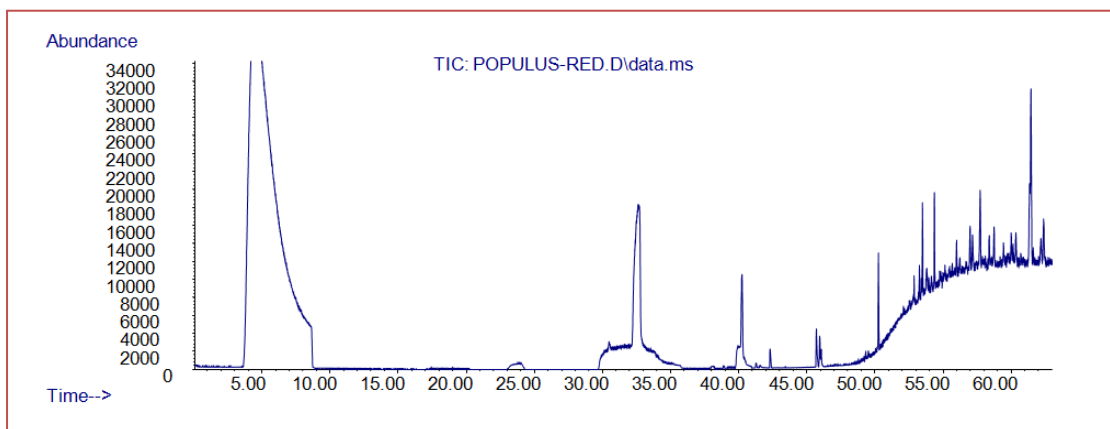
Cromatograma TIC 27. Cromatograma TIC del polen OLIVO, fibra roja.



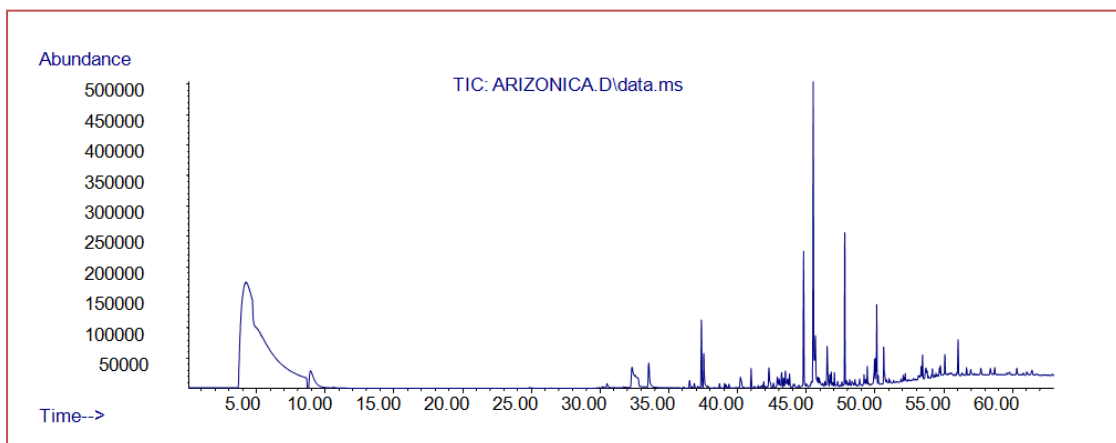
Cromatograma TIC 28. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra azul clara.



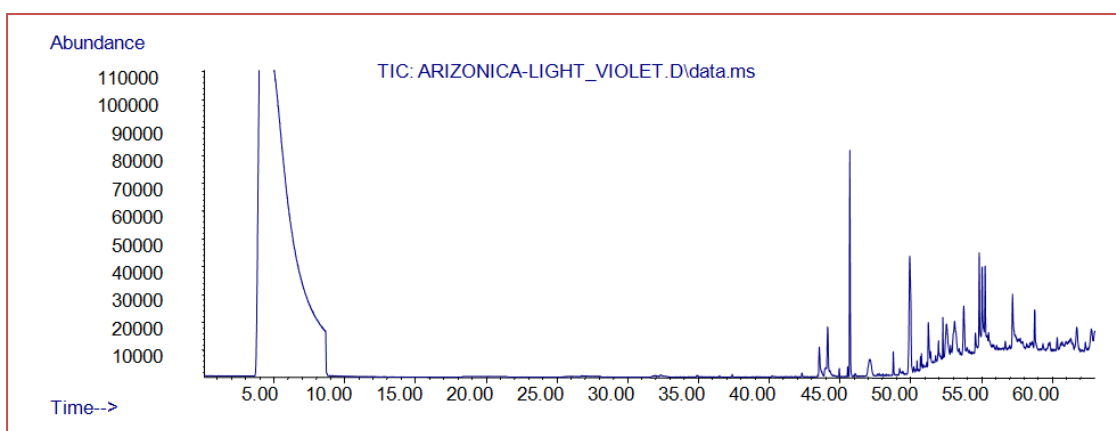
Cromatograma TIC 29. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra violeta clara.



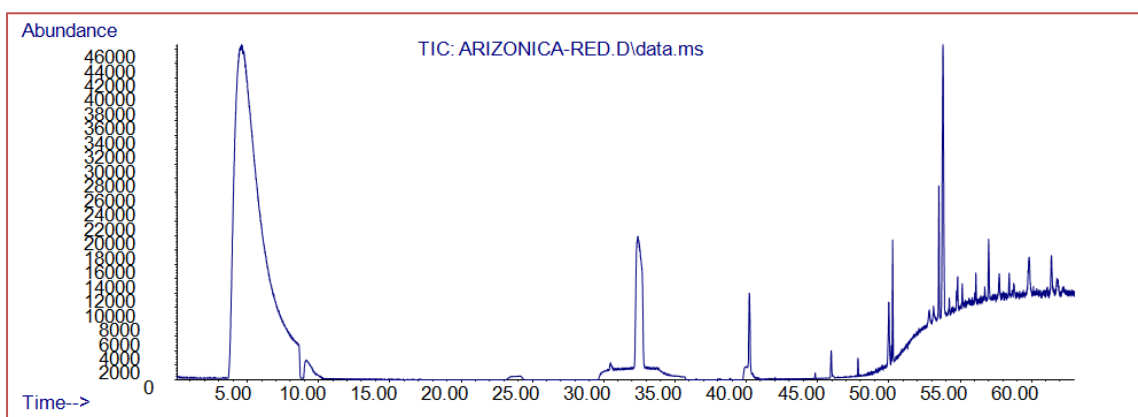
Cromatograma TIC 30. Cromatograma TIC del polen POPULUS, fibra roja.



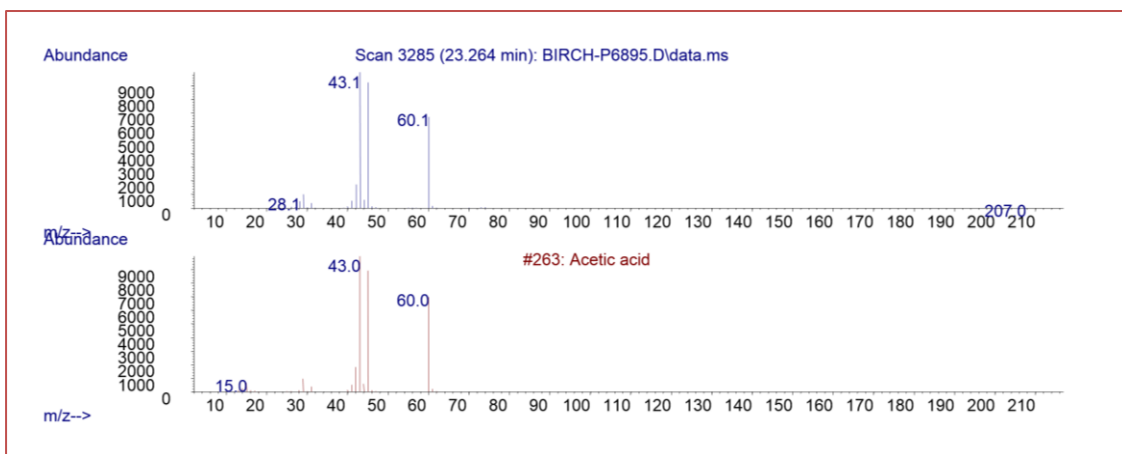
Cromatograma TIC 31. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra azul clara.



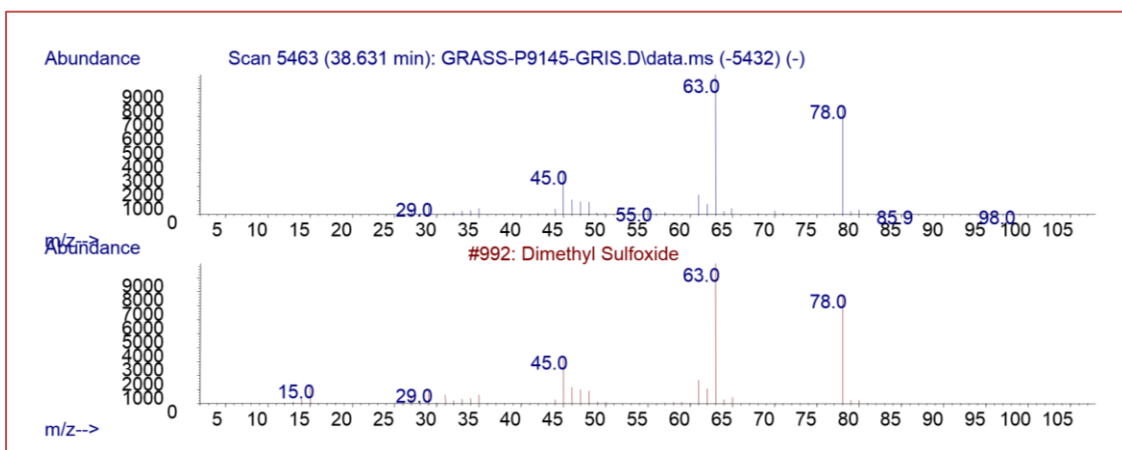
Cromatograma TIC 32. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra violeta clara.



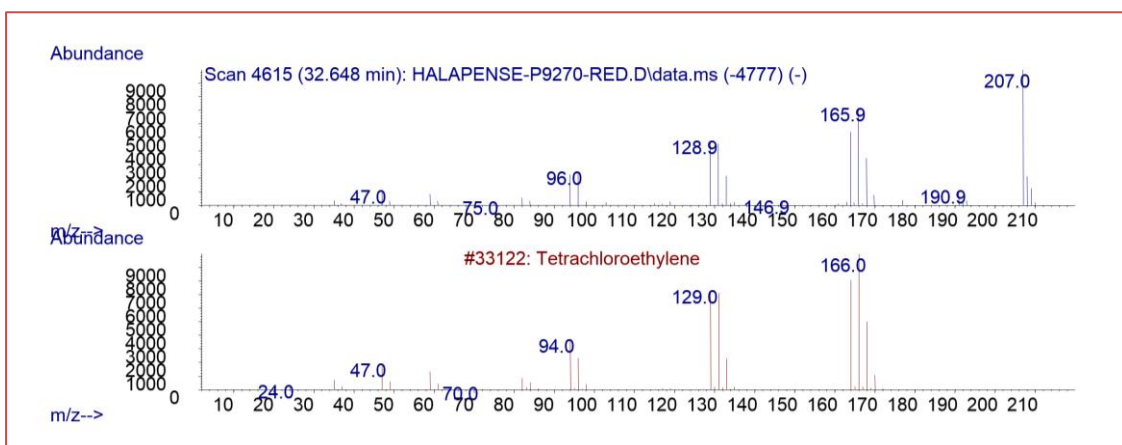
Cromatograma TIC 33. Cromatograma TIC del polen ARIZÓNICA, fibra roja.



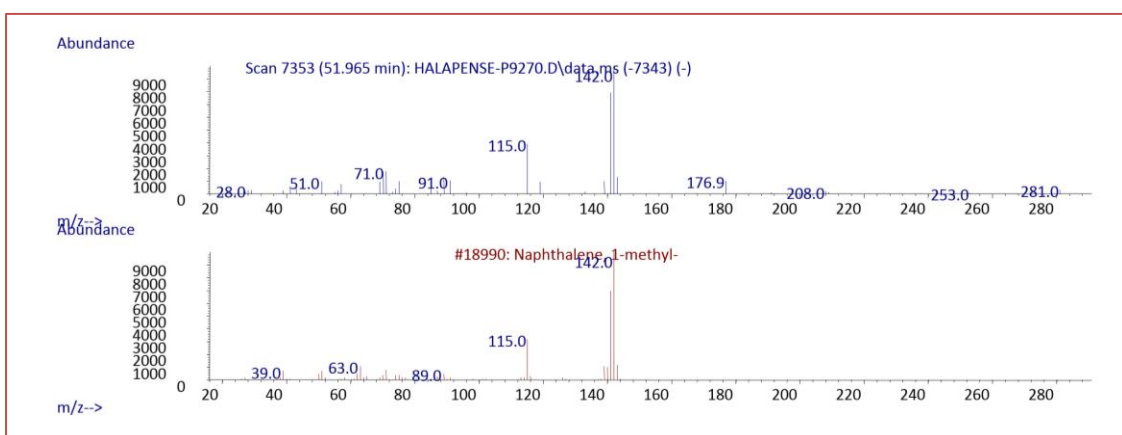
Espectro de masas 1. BIRCH, fibra azul clara, pico cromatográfico a 23,264 minutos, identificado como ácido acético.



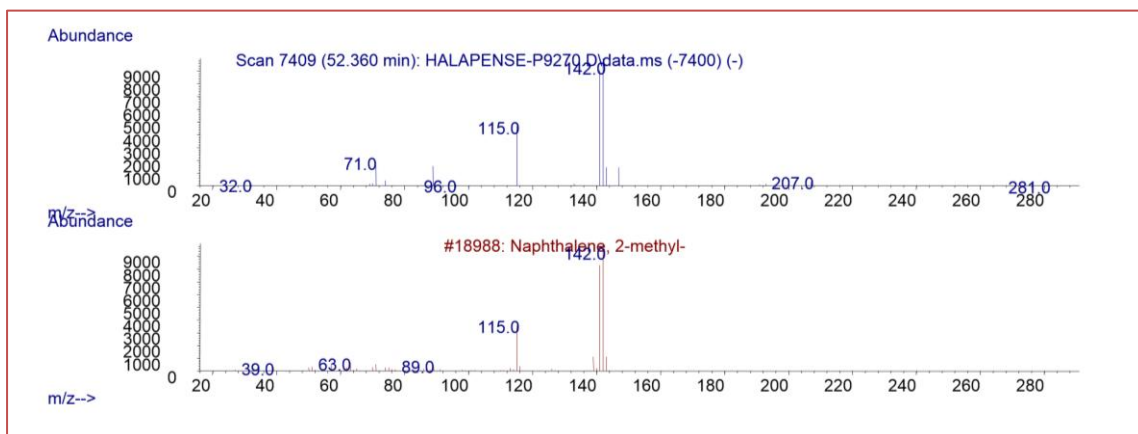
Espectro de masas 2. GRASS, fibra gris, pico cromatográfico a 38,631 minutos identificado como dimetilsulfóxido.



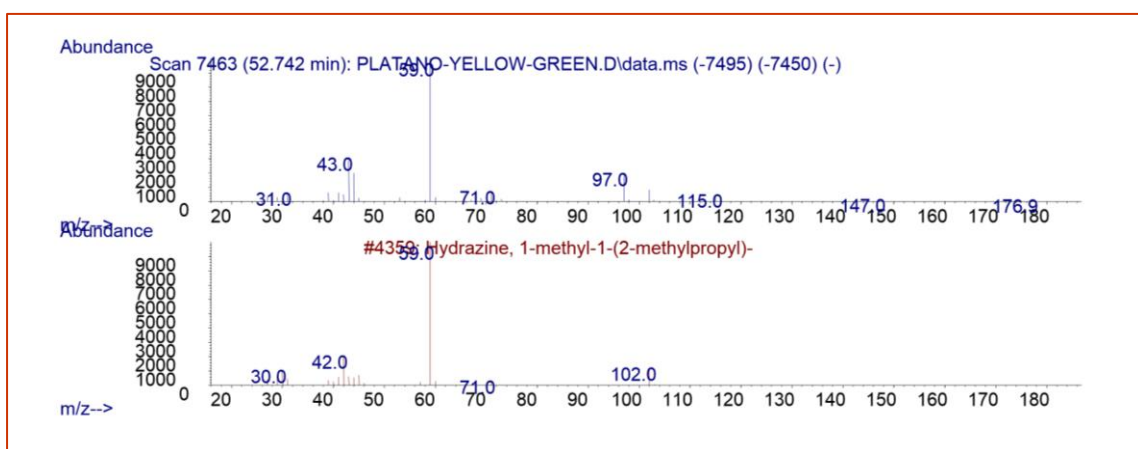
Espectro de masas 3. HALAPENSE, fibra roja, pico cromatográfico a 32,648 minutos identificado como tetracloroetileno.



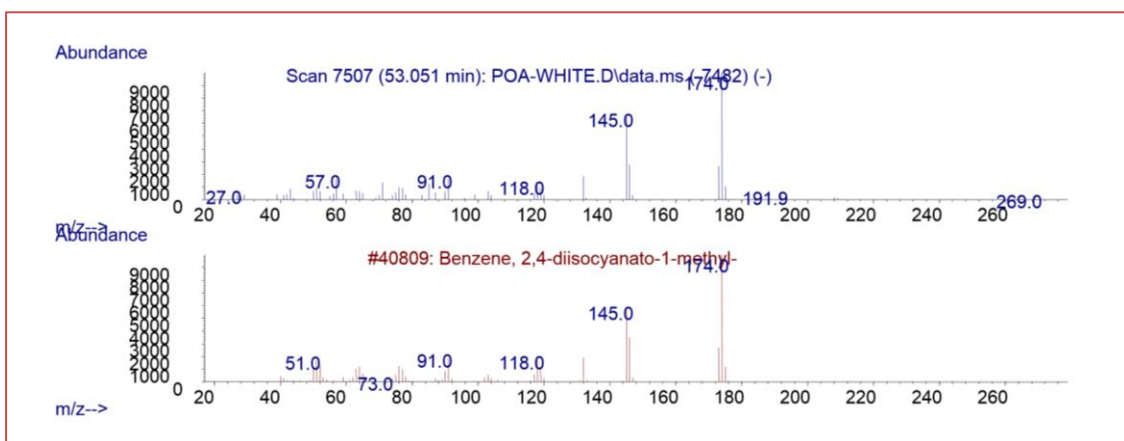
Espectro de masas 4. HALAPENSE, fibra zul claro, pico cromatográfico a 51.965 minutos identificado como 1-metil-naftaleno



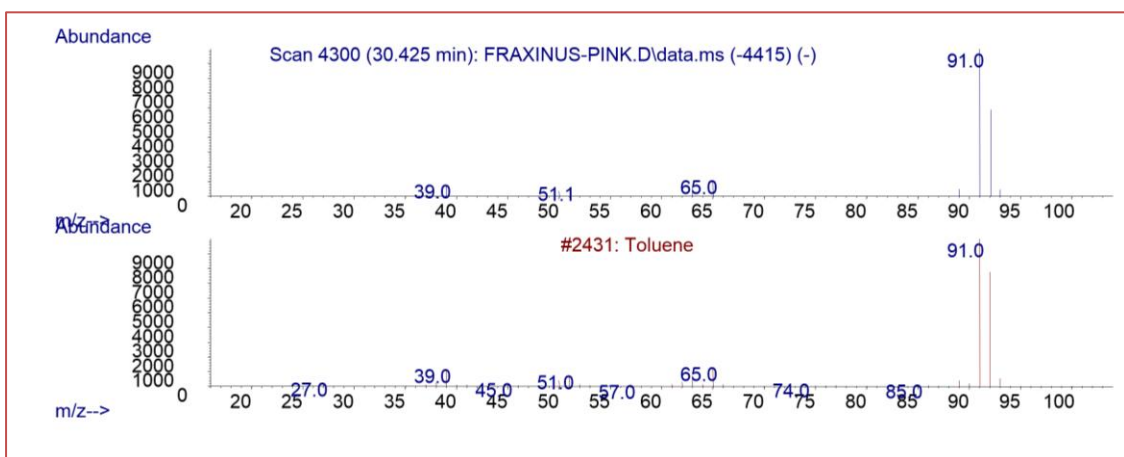
Espectro de masas 5. HALAPENSE, fibra azul claro, pico cromatográfico a 52.360 minutos identificado como 2-metil-naftaleno.



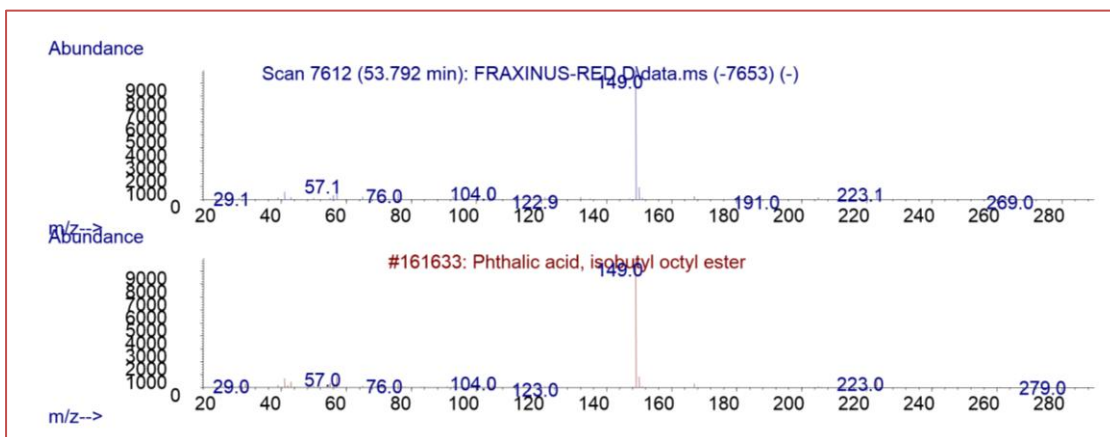
Espectro de masas 6. PLÁTANO, fibra verde-amarilla, pico cromatográfico a 52.742 minutos identificados como 1-metil-2(2-metilpropil)-hidracina.



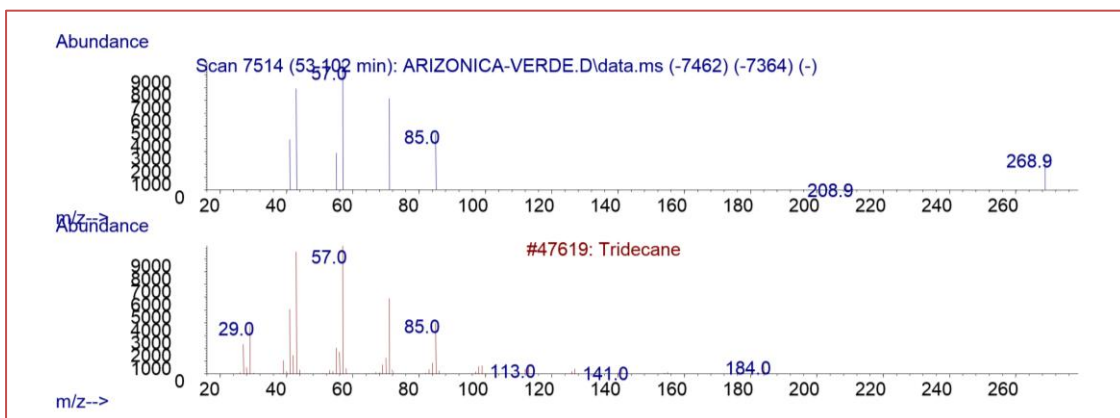
Espectro de masas 7. POA, fibra blanca, pico cromatográfico a 53.051 minutos identificado como 1-metil, 2,4-diisocianato-benceno.



Espectro de masas 8. FRAXINIUS, fibra rosa, pico cromatográfico a 30.425 identificado como tolueno.



Espectro de masas 9. FRAXINIUS, fibra roja, pico cromatográfico a 53.792 minutos identificado como isobutil-octil ftalato.



Espectro de masas 10. ARIZÓNICA, fibra verde, pico cromatográfico a 53.102 minutos identificado como tridecano.

8. ANEXO III: Procedencia de algunos VOCs presentes en el polen.

Nº	Nombre	Fuente probable	Descripción	Referencia Bibliográfica
1	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	Contaminante	Biodiesel (familia de compuestos de ésteres del propanetriol)	131
2	1-Butanol, 3-methyl-	Natural	Elemento principal de la producción de aceite de banana y el principal	132
		Contaminante	Reactivo de la reacción de Kovac	133
3	1-Hexanol, 2-ethyl-	Contaminante	Material de construcción: Se produce por la hidrólisis entre di-2-etilhexil ftalato utilizado como plastificante en el material del suelo y la humedad generada a partir de un material fuertemente alcalino, tal como la losa de hormigón	134
4	1H-Imidazole, 2-ethenyl- (Más conocido por 2-Vinylimidazole)	Natural	Sustancia antiviral de origen natural marino (algas, esponjas, etc.)	135
		Contaminante	Se sintetiza por muchas vías por su actividad como fungicida u otras	136

Nº	Nombre	Fuente probable	Descripción	Referencia Bibliográfica
5	1-Octene	Contaminante	<ul style="list-style-type: none"> - Se utiliza como adhesivo - Para polimerización y obtención de HDPE 	137 138
6	1-Tetradecene	Contaminante	Diesel en perforaciones marinas	139
7	2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	Contaminante	Del petróleo, también se sintetiza porque es muy importante para la producción de gomas, plásticos y disolventes	140 141
8	2-Butenal, (E)- Muy conocido como cronotaldehyde	Contaminante	Componente mayoritario del humo del tabaco y de la contaminación ambiental	142 143
9	2-Decenal, (E)-	Contaminante Natural	<ul style="list-style-type: none"> - Componente de un herbicida - Componente de aroma de ciertas plantas 	144
10	2-Pyrrolidinone También conocido como M-Pyrol ; N-Methyl- α -pyrrolidinone;	Contaminante	Disolvente extraordinario para pinturas y polímeros	145

Nº	Nombre	Fuente probable	Descripción	Referencia Bibliográfica
11	4-Hexen-3-one	Contaminante	Tratamiento en plantas, fungicidas, pesticidas (leer referencias, porque sospecho que es natural)	146
12	Diethyl Phthalate	Contaminante	<ul style="list-style-type: none"> - Plásticos - Plásticos, disolventes, etc. Importante por las referencias 	147 148
13	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Contaminante No sé si otro	Disolvente y degradación de Dimetil sulfona	149
14	Dodecane	Contaminante	<ul style="list-style-type: none"> - Detectado en el humo de los coches diesel. - VOCs a los que el hombre está expuesto. - Contaminación de petróleo en pescado. 	150 151
15	Eicosane	Contaminante	<ul style="list-style-type: none"> - Contaminación de petróleo en pescado (VOCS mediante SPME). - Presente en células de cáncer de pulmón 	151 152

Nº	Nombre	Fuente probable	Descripción	Referencia Bibliográfica
16	Ethanamine, N-ethyl-N-nitroso- Sinónimos: Nitrosomethylethylamine; Nitrosoethylmethylamine.;N-Nitrosoethylmethylamine;N,N-Methylethylnitrosamine;N-Methyl-N-nitroso-ethamine y NMEA	Contaminante	- Compuesto detectado en orina tras exposición de humo de tabaco.	153
			- Compuestos cancerígenos y mutágenos.	154
			- Formación de NMEA en el proceso de desinfección de aguas y lodos con cloro.	155
17	Formamide, N,N-dimethyl- Sinónimos: Dimethylformamide (DMF)	Contaminante	- Como disolventes, en plásticos y fibras.	156
			- Fabricación de pesticidas.	157
			- Aliento de personal laboral en industria con disolventes peligrosos	158
18	Formic acid, heptyl esterTambién conocido como heptyl formate	Contaminante	Insecticida para las moscas de casa	159
				160
19	Heptadecane, 9-octyl- también conocido como 9-octylheptadecane	Contaminante	Compuesto industrial	161

9. ANEXO IV: Divulgación científica ¹

¹ Se presenta el manuscrito enviado a TALANTA JOURNAL (ELSEVIER) el 10/07/2015, a la espera de su revisión por la editorial.

A SIMPLE SCREENING METHOD BY HS-SPME-GC/MS TO IDENTIFY AND SEMI-
QUANTIFY VOCs IN POLLEN.

ABSTRACT

An HS-SPME-GCMS method is applied to identify and semi-quantify detected volatile organic compounds (VOCs) in three allergenic pollen samples. Eight solid phase microextraction fibers of different polarity were used for screening purposes. Endogenous and exogenous or contaminant VOCs have been differentiated according to criteria in the available bibliography. Semi-quantification was made using a mixture containing three VOCs. Around 150 compounds were detected, most of which are common in flower scent; moreover high concentration levels of contaminants, such as tetrachloroethylene, p-xylene and toluene were detected. Pollen VOCs are being tried out as markers of environmental pollution.

KEYWORDS: VOCs; Pollen; Pollutants; SPME-GCMS.

1. INTRODUCTION

The effects of unhealthy air particles have been widely studied. Air particles have a complex composition, including sand and diesel particles (DEP) [1]. An important component of air particles is pollen, especially during pollinization periods; therefore, pollen released into the air forms part of bio-aerosols of different sizes, shapes and densities, which are often associated with allergy-related diseases [2,3]. As is well-known, pollen is the male gamete produced by spermatophyte plants; pollen morphology is very different depending on whether fertilization is produced by insects (entomophilous pollen, such as bee pollen) or by wind (anemophilous pollen, such as birch pollen) [4,5] Generally, entomophilous pollen is heavier and more adhesive than anemophilous pollen; therefore, more concentration of anemophilous pollen is found in the atmosphere. Consequently, this pollen has been widely studied with different aims. From the medical point of view, a great amount of work has been undertaken regarding allergenic pollen immunology in different matrices, for instance, in human lung epithelial cells. It is accepted that pollen contamination and environmental changes have increased allergic diseases in the last decade; in particular, the presence of DEP in air particles could produce an unhealthy synergic effect. Consequently, a lot of research using immunoassays has been done into the increase in the IgE antibody caused by DEP and other allergens [6,7,8,9,10].

Pollen research has been undertaken mainly in the fields of biology and ecology; pollen morphology and the relation between honey and pollen are the most common studies carried out by microscopy techniques in order to identify the botanical origin of honey. Volatile organic compounds (VOCs) produced by flowers which are attractive to insects have been determined using different analytical techniques such as head space-gas chromatography mass spectrometry (HS-GCMS) and solid phase microextraction-GCMS. Several studies have been carried out by environmental scanning electron microscopy (ESEM) in order to identify which part of the flower produces aromatic compounds [11]. It should be pointed out that important research has been carried out to determine pollutants in bee pollen in order to find the most probable cause of Colony Collapse Disorder (CCD); for example, pesticide pollutants have been determined by direct injection in GCMS and liquid chromatography-MS techniques in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

flowers, bee pollen and flower pollen [12]. The dispersion and distribution of pollen particles in air have been studied in order to predict their distribution during pollination periods [13].

In this work, an HS-SPME-GCMS method has been developed to determine VOCs in allergenic pollen; eight SPME fibers have been tested using three anemophily pollens for screening purposes and as markers of environmental pollution; Sorghum Halapense, Secale Cereale and water birch pollens. Moreover, endogenous and exogenous or contaminant VOCs have been differenced according to the criteria in the available bibliography.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Equipment and material

Chromatographic analyses were carried out on a GC 7890A coupled with 5975C quadrupole mass spectrometer (both from Agilent Technologies, Palo Alto, USA). A VA624 cross-linked 5% diphenyl-95%dimethyl polysiloxane (60 m x 0.25 mm I.D., 1 µm film thickness, VARIAN) capillary column was used. The SPME process was carried out in the MPS2XL Multifiber Change from Gerstel autosampler installed in the chromatograph.

A NURKA 390® Fiber Conditioning independent system (Nurka, Madrid, Spain) was used for conditioning and cleaning the fibers.

A Mettler Toledo model AX105 precision balance (Barcelona, Spain) with chemical safety cabinet and ± 0.00001 g accuracy was used.

Eight SPME fibers from SUPELCO, (Bellefonte, PA, USA) were used: An 85 µm carboxen/polidimethylsiloxane (CAR/PDMS), an 85 µm polyacrilate, a 70 µm carbowax/divenylbenzene (CW/DVB), a 7 µm polidimethylsiloxane (PDMS), a 100 µm PDMS, a 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), a 50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) and a 60 µm polyethylene glycol (PEG) were used for extraction process.

SPME 20 mL glass vials with screw cap and PTFE/silicone from SUPELCO were used (Bellefonte, PA, USA).

A Liebherr fridge model 4113 (Pamplona, Spain) was used to conserve the pollen samples in a 2 – 4°C temperature range.

2.2. Pollen samples

Grass pollen from Sorghum Halepense, grass pollen from Secale Cereale and tree pollen from water birch were supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, USA). All of them were kept at 4°C in the fridge until their analysis.

2.3. Organic Solvents

Benzyl alcohol, toluene, dichloromethane and hexane were supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and n-octadecane was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.4. Solvent standard mixture used for VOCs semiquantification

A mixture of benzyl alcohol, toluene and n-octadecane at 10, 100 and 100 mg/Kg, respectively, was prepared in a Dichloromethane: Hexane, (1:1; v: v) solvent. It was used for spiking purposes; 20 mg of Sorghum Halepense pollen were added to each of eight SPME glass vials and they were enriched with one microliter of this mixture.

3. PROCEDURE

3.1. SPME fiber conditioning

Each fiber was conditioned during 20 minutes in the *NURKA®390 Fiber Conditioning*, passing through a nitrogen flow at 20 mL/min at the temperature recommended by the manufacturer. The fiber was placed in the autosampler and HS-SPME was carried out.

3.2. Head Space-Solid Phased Micro Extraction

20 mg of the powdered pollen was weighed accurately in an SPME glass vial which was placed on the GCMS autosampler tray to undergo the automatic SPME process. The extraction was carried out during 60 minutes at 70°C and at 250 rpm. Thermal desorption was carried out on the fibers inside the GC injector in splitless mode during 5 minutes at the temperature recommended by the supplier.

3.3. VOCs analysis by GCMS

The oven temperature was programmed at 40°C for 15 minutes, then a 3°C/min ramp was applied up to 60°C, maintained for 1 minute and then followed by a 5°C/min ramp up to 160 °C. This was also maintained for 1 minute, and finally, a 10°C/min ramp to 240°C was programmed and maintained for 11.3 minutes. Total run time was 63 minutes. The transfer line and ion source temperatures were 280 and 230°C, respectively. Electron impact ionization was made at 70 eV using total ion scan acquisition mode in the range 25-650 m/z. The peaks in the gas chromatogram were identified by comparing their spectra with those present in the NIST mass spectra database, version 2.0d, 2005.

3.4. VOC semiquantification in the samples

The VOC standard mixture was used to semiquantify the detected VOCs; toluene, benzyl alcohol and n-octadecane were taken as reference compounds in the retention time ranges of 0-41, 41.1-50 and 50.1-63 minutes, respectively. The endogenous content of toluene, benzyl alcohol and n-octadecane was determined by subtracting the amount added.

4. RESULTS

4.1. Optimization of analytical method

The best experimental conditions are specified in section 3. The optimization was made by fixing all the variables except the one studied, which was changed systematically. On the chromatograph, the main parameter ranges studied were splitless time (0.5 – 10 minutes) and temperature program (40°C to 240°C) in three different ramps.

A factorial design was used to optimize the working conditions of SPME; for this propose three factors including extraction temperature (A), extraction time (B), agitation (C) and two response variables the number of extracted compounds and the obtained area of toluene) were established. Factors A and B were coded at three levels and factor C was coded at two levels (Table 1). The complete design consisting of 20 experimental points and including one replication is shown in Table 2. The 20 sets of experiments were performed in a random order in order to minimize the effects of the uncontrolled factors.

Pareto charts are generally used to illustrate the influence of the independent factors as well as their interactions on the response of the analysis (Chang et al., 2011) and the surface plots show the optimum conditions for each variable. The results obtained for each variable are shown below:

- a) Variable "Number of detected peaks": The Pareto chart is shown in Figure 1 and it shows that the temperature and agitation factors produce positive effects over this variable with temperature being more important. However, the extraction time presents a slight negative effect over this variable. The surface plot is shown in Figure 2 and presents the optimum conditions, which are detailed in Table 3.
- b) Variable "Toluene area": The Pareto chart is shown in Figure 3 and it shows that the extraction time and agitation factors produce positive effects over this variable with agitation being more important. However, the extraction temperature presents a slight negative effect over this variable. The surface

plot is shown in Figure 4 and presents the optimum conditions, which are detailed in Table 4.

Regarding the obtained results in the complete factorial design described previously, the optima conditions for two variables is detailed in table 5

4.2. VOC analysis of three pollen samples

Volatile compounds in pollen samples were semi quantified using eight different fibers as indicated in section 2.1. Pollen samples were analysed by applying the procedure specified in section 3.3 and TIC chromatograms were used for VOC identification.

Semiquantification was carried out as indicated in section 3. The results obtained using the different fibers are shown in Table 6. Chromatograms obtained from both an unfortified and fortified samples are shown in Figure 5. The chromatograms of the unfortified pollen sample were divided into three sections: the first section includes VOCs detected between approximately 0 and 41 minutes which were semi quantified using toluene as a standard compound; VOCs detected between approximately 41.1 and 50 minutes were semi quantified using benzyl alcohol while VOCs detected between 50.1 and 63 minutes were semi quantified using n-octadecane.

Endogenous and exogenous VOC compounds have been differenced in accordance with criteria in the available literature. After studying VOCs detected using the eight fibers and using different criteria some general comments can be made.

Type of fiber and retained VOC:

- Using the 85 μm CAR/PDMS fiber, the highest number of detected VOCs was in grass pollen. The combination of these two stationary phases supplied major retention capacity for small compounds, such as those found in grass pollen[14, 15].
- By the contrary, using 7 μm PDMS fiber, Halepense pollen gave the lowest number of detected VOCs; in fact, only one. The PDMS stationary phase retained mainly non polar and high molecular weight compounds, due to its low thickness. [16].
- Some other VOCs were retained in different fibers; for example, about 1 mg/kg of Butyrolactone (42.27 min) was detected in the Sorghum Halepense sample

using two fibers (85 µm PA and 60 µm PEG) and 4 mg/Kg of this compound were detected in Secale Cereale and in Water Birch pollen using three fibers (85 µm PA with a 60 µm PEG and 70 µm CW/DVB). It seems apparent that Butyrolactone has more affinity for the 85 µm PA and 60 µm PEG fibers than for the 70 µm CW/DVB fiber.

Pollen and type of retained VOC:

- Grass pollen contained the highest number of VOCs, mainly alcohols, furans and esters. Most of them were extracted on the 85 µm CAR/PDMS, 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 85 µm PA and 60 µm PEG fibers. Using other fibers, only 12 VOCs were not detected: Oxime-methoxy-phenyl-; 4-hexen-3-one; 2-methyl-buten-2-ol; benzeneacetaldehyde; 3-aminopyrazole; 1-dodecene; 2,6-nonadienal; 2(3H)-furanone-5-acetyldihydro; 1-heptadecane; vanillin; ethanol 2-(tetradecyloxy) and tetradecanal.
- On the contrary, the lowest number of VOCs was detected in Halepense pollen, mainly ketones/aldehydes and esters. Most of them were extracted on the 85 µm PDMS/CAR, 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 65 µm PDMS/DVB and 60 µm PEG fibers. On other fibers, only 10 VOCs were not detected: 4-hexen-3-one; 3,5-octadien-2-one; nonanal 3-aminopyrazole; phenylethyl alcohol 4H-pyran-4-one; 2,3-dihydro-6-methyl; 2-undecanone 6,10-dimethyl; 2(3H)-furanone 5-heptyldihydro-; sulphurous acid; pentadecyl 2-propyl ester and phenol, 2, 4-bis(1, 1-dimethylethyl).
- Fifty eight VOCs were detected in birch pollen, mainly alcohols, ketones and carboxylic acid. Most of them were extracted on the 85 µm CAR/PDMS, 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 65 µm PDMS/DVB, 85 µm PA and 60 µm PEG fibers. On other fibers, only 10 VOCs were not detected: 1-octanol; 3-aminopyrazole; 1-dodecene; 1-tetradecanol; 2-nonenal (E); copaene; heptadecane; sulphurous acid, pentadecyl 2-propyl ester and 10-methylnonadecane.

As could be expected, these results indicate that no one fiber is suitable for screening purposes.

Source of detected VOCs

Most VOCs detected in pollen are endogenous compounds and come from aroma flowers; for instance, benzeneacetaldehyde comes from soy sauce; benzaldehyde is detected in *Prunus Cerasus* and decanal comes from citrus trees.

Furthermore, relevant pollutant compounds were detected and some of them are marked in Table 1. As can be seen, tetrachloroethylene was detected in Halepense pollen using most of the fibers, due to its high concentration. This compound is considered an environmental contaminant and it is associated with the dry cleaning industry worldwide [17]. Most of the BTEX compounds were detected in the three pollen samples. Ethylbenzene and p-xylene were present at the same concentration level, around the 7 - 23 mg/Kg. However, toluene was present in *Secale Cereale* at high concentration, about 73 mg/Kg [18]. N-ethyl-N-nitroso ethanamine, which is associated with tobacco smoke, was detected in *Secale Cereale* and in water birch pollens; it is thought to be a cancerous compound and it is produced during water disinfection using chlorine [19]. N,N-dimethyl-formamide was detected in the three pollen samples, the highest concentration level being found in *Secale Cereale*, about 9 mg/Kg. It was used as a plastic solvent and it was associated with pesticide manufacture; it was detected in the saliva of synthetic leather workers by SPME-GCMS [20]. Monoacetate 1,2,3-Propanetriol was detected in *Secale Cereale* at 4 mg/Kg and in water birch at 0.5 mg/Kg; this compound is related to fuel biodiesel [21]. Isobutyl undecyl ester phthalic acid was detected in the three pollen samples with the highest concentration of 26 mg/kg being found in water birch; these compounds are well known in the plastic industry and possibly come from the sample containers.

5. CONCLUSIONS

Volatile organic compounds from Sorghum Halepense, Secale Cereale and water birch allergenic pollen samples were identified and semi-quantified by HS-SPME-GCMS. An exhaustive screening of VOCs required the use of all the SPME fibers available on the market.

Most VOCs present in pollen come from scented flowers; however, anthropogenic compounds, such as tetrachloroethylene, p-xylene or toluene, were detected in three studied pollens; so, pollen samples can be used as environmental pollution biomarkers.

The novelty of this research resides in considering pollen to be a marker for environmental pollution. Moreover, identifying volatile organic compounds using all possible SPME fibers allows the detection of all pollutants present in the air, which have stuck to the surface of the pollen.

REFERENCES

- [1] Diaz-Sanchez D, P. L. (2003). Diesel fumes and the rising prevalence of atopy: an urban legend? *Curr Allergy Asthma Rep.*, 3(2), 146-152.
- [2] AERODYNAMIC CHARACTERISTICS OF SACCATE POLLEN GRAINS. (March de 2013). *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, 174(3), 499-510. doi:10.1086/668694
- [3] G. Karrera, C. S. (2015). Ragweed (Ambrosia) pollen source inventory for Austria. *Science of The Total Environment*, Volume 523(1), 120–128. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.108
- [4] Raju, A. J., Ramana, K. V., & Chandra, P. (May de 2013). FLORAL ECOLOGY AND POLLINATION IN ERIOLAENA LUSHINGTONII (STERCULIACEAE), AN ENDEMIC AND THREATENED DECIDUOUS TREE SPECIES OF SOUTHERN PENINSULAR INDIA. *Journal of ThreatenedTaxa.*, 5(9), 4359-4367.
- [5] Špela Peternel, J. G.-P., & Komel, R. (2008). Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microbial Cell Factories*.
- [6] Bert Brunekreef, S. T. (2002). Air pollution and health. *THE LANCET*, 360, 1233-1242.
- [7] G. Mazzearella, V. E. (2012). Inflammatory effects on human lung epithelial cells after exposure to diesel. *Environmental Pollution*, 161, 64-69.
- [8] G. Mazzearella, F. F. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung. *Respiratory Medicine*(101), 1155–1162.
- [9] G. Mazzearella, F. F. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung. *Respiratory Medicine*(101), 1155–1162.
- [10] Andre E. Nel, M. D.-S. (1998). Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *Updates on cells and cytokines*, 539-555.

-
- [11] Sebastien Ibanez, S. D. (2010, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03317.x). The role of volatile organic compounds, morphology and pigments of globe-flowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytologist*, 1-13.
- [12] Laure Wiest (2011; doi:10.1016/j.chroma.2011.06.079). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(34), 5743– 5756.
- [13] M. A. Jiménez, A. M. (2008, <http://dx.doi.org/10.1175/2008MWR2461.1>). Verification of a Clear-Sky Mesoscale Simulation Using Satellite-Derived Surface Temperatures. *American metrology society; Volume 136, Issue 12 (December 2008)*, 5148–5161.
- [14] ZHANG, Z., YANG, M., & PAWLISZYN, J. (1994). SOLID-PHASE MICROEXTRACTION. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 66 (17), A844-A853.
- [15] Gorecki, T., Yu, X., & Pawliszyn, J. (1999). Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *ANALYST*, 124 (5), 643-649.
- [16] Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Ontario, Canadá: WILEY.
- [17] Everatt, R., Slapsyte, G., Mierauskiene, J., Dedonyte, V., & Bakiene, L. (2013). Biomonitoring Study of Dry Cleaning Workers Using Cytogenetic Tests and the Comet Assay. *JOURNAL OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL HYGIENE*, 10(11), 609-621.
- [18] Ana Esplugues a, b. F.-L.-L. (2010;10.1016/j.scitotenv.2010.09.039). Indoor and outdoor air concentrations of BTEX and determinants in a cohort of one-year old children in Valencia, Spain. *Science of the Total Environment*, 1-10
- [19] Natalia Campillo, P. V.-C.-C. (April de 2011). Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(14), 1815-1821.

1 [20] Dmitrii L. Obydenov, E. S. (2013). A novel, two-step synthesis of 4-pyridone-3-
2 carboxamides from 2-cyano-4-pyrones. *Tetrahedron Letters*, 54(24), 3085–3087.
3
4
5
6
7 [21] Sergey P. Verevkin, V. N. (2009). Thermochemical and Ab Initio Studies of
8 Biodiesel Fuel Surrogates: 1,2,3-Propanetriol Triacetate, 1,2-Ethanediol Diacetate, and
9 1,2-Ethanediol Monoacetate. *Ind. Eng. Chem. Res.*, DOI: 10.1021/ie900308u, 48(15),
10 7388–7399.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Amparo Escribano Otero

De: Amparo Escribano [amparoescibano@gmail.com]
Enviado el: lunes, 20 de julio de 2015 12:28
Para: Amparo Escribano Otero
Asunto: Fwd: FW: A manuscript number has been assigned: TAL-D-15-02094

-----Original Message-----

From: ees.tal.0.32a09d.f60b0ced@eesmail.elsevier.com
[mailto:ees.tal.0.32a09d.f60b0ced@eesmail.elsevier.com] On Behalf Of TALANTA
Sent: Thursday, July 16, 2015 5:22 PM
To: kayali@quim.ucm.es
Subject: A manuscript number has been assigned: TAL-D-15-02094

Ms. Ref. No.: TAL-D-15-02094
Title: A SIMPLE SCREENING METHOD BY HS-SPME-GC/MS TO IDENTIFY AND SEMI-QUANTIFY VOCs IN POLLEN.
Talanta

Dear nourkayali,

Your submission entitled "A SIMPLE SCREENING METHOD BY HS-SPME-GC/MS TO IDENTIFY AND SEMI-QUANTIFY VOCs IN POLLEN." has been assigned the following manuscript number: TAL-D-15-02094.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tal/>.

Your username is: nourkayali
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/tal/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Administrative Support Agent
Administrative Support Agent [03-Feb-15] Talanta

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

--
Amparo Escribano Otero. <http://es.linkedin.com/in/amparoescibanootero>

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

10. Referencias

1 K. Shukla, M. R. (1998). Abiotic pollination. APH Publishing

2 Gayo, S. H. (2001). Biología molecular y caracterización inmunológica de dos alergenios principales del polen de olivo:ole e 1 y ole e 9; Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

3 García Hernández, J. (2010). Detección de los niveles de proteínas alergénicas en el aire de la Europa (Ole e 1). Cuantificación por métodos inmunológicos. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena

4 Gwo-Ing, L., Ming-Yih, C., & Chang-Sheng, K. ((2005) 46). Pollen morphology of Cucuta (Convolvulaceae) in Taiwan. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei* , 75-81.

5 León, D. d. (s.f.). <http://www.saludcastillayleon.es>. Recuperado el 21 de Enero de 2014, de http://www.saludcastillayleon.es/sanidad/cm/ciudadanos/images?locale=es_ES&textOnly=false&idMmedia=113491

6 MONIKA BARTH, O., LAURIA JUSTO, R., & AGUIAR DE BARROS, M. (1998). CATÁLOGO SISTEMÁTICO DO PÓLEN DAS PLANTAS ARBÓREAS DO BRASIL MERIDIONAL. XXX: MELIACEAE. *Revista Brasileira de Biologia* , 58 (3).

7 Llorens, M. (2008). Estudio palinológico de la Formación Punta del Barco, Cretácico Inferior (Aptiano) de la provincia de Santa Cruz, Argentina. Descripciones sistemáticas II: esporas triletes apiculadas, murornadas, tricrasadas y perinadas. Implicancias paleoecológicas. *Ameghiniana* , 45 (2).

8 Archangelsky, A., & Llorens, M. (2005). Palinología de la Formación Kachaike, Cretácico Inferior de la Cuenca Austral, provincia de Santa Cruz. II. Esporas. *Ameghiniana* , 42 (2).

9 Forcone, A., García, J., & Ayestar, G. (2006). Polen de las Mieles de la Patagonia Andina (Chubut-Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* , 41 (1-2).

10 Archangelsky, S., & Archangelsky, A. (2010). Revisión taxonómica y estratigráfica de esporas cicatricosas del Cretácico Inferior de Patagonia. 1. Géneros Appendicisporites Weyland & Krieger, Nodosisporites Deák y Plicatella Maljavkina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales* , 10 (1).

11 Archangelsky, S., & Archangelsky, A. (2010). Revisión taxonómica y estratigráfica de esporas cicatricosas del Cretácico Inferior de Patagonia. 1. Géneros Appendicisporites Weyland & Krieger, Nodosisporites Deák y Plicatella Maljavkina. *Sergio Archangelsky & Ana Archangelsky* , 12 (1).

12 Piñeiro, M., & Morbelli, M. A. (2012). Morfología y ultraestructura de las esporas de *Nephrolepis cordifolia* (Davalliaceae) del Noroeste de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica (PALEOBOTÁNICA Y PALINOLOGÍA)* , 47 (1-2).

13 Red Española de Arboledas. (1992). *REA*. Recuperado el Enero de 2014, de <http://www.uco.es/rea/index.htm>

14 Consejería de Sanidad de la CAM. (s.f.). *Niveles de Polen*. Recuperado el Febrero de 2014, de http://www.madrid.org/cs/Satellite?vest=1156329829961&pagename=PortalSalud%2FPagina%2FPagina_servicioPrincipal&cid=1265185299945&language=es

16 J.R. Regueiro, C. L. (2006). *Inmunología, Biología y Patología del sistema inmune*. Madrid: Médica Panamericana.

17 Janeway, T. W. (2005). *Immuno Biology*. New York: Garland Science Publishing

18 Hergenreder, G. (2007). *Biología (Blog)*. Recuperado el Enero de 2014, de <http://biologiaprofegustavo.blogspot.com.ar/2013/07/sistema-inmunologico.html?view=magazine>

19 Francisco Teixidio Gómez; Teresa Velasco Sanz; Luis Fernández López; José A. Pascual Trillo; Consuelo Sánchez; Saturnino Muñoz Martínez. (2009). Inmunología. En *BIOLOGIA 2* (págs. 360-381). Madrid: McGrawHill.

20 Solomon, W. (1984). Aerobiology of pollinosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 74, 449-61.

21 Taylor, A., Swanson, M., Jones, R., Vives, R., Rodríguez, J., Yunginger, J., y otros. (2000). Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 105 (1), 166-9.

22 Zhang, L., Wang, Y., Sun, C., Yang, S., & He, H. (2013). Simultaneous Determination of Organochlorine, Organophosphorus, and Pyrethroid Pesticides in Bee Pollens by Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by Gas

Chromatography Using Electron-Capture Detector. *FOOD ANALYTICAL METHODS*, 6 (6), 1508-1514

23 Castro-Vazquez, L., Leon-Ruiz, V., Alanon, M., Perez-Coello, M., & Gonzalez-Porto, A. (2014). Floral origin markers for authenticating Lavandin honey (*Lavandula angustifolia* x *latifolia*). Discrimination from Lavender honey (*Lavandula latifolia*). *FOOD CONTROL*, 37, 362-370.

24 Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G., & Caboni, M. (2013). Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. *FOOD CHEMISTRY*, 141 (3), 2802-2811.

25 Cornara, L., Borghesi, B., Canali, C., Andrenacci, M., Basso, M., Federici, S., y otros. (2013). Smart drugs: green shuttle or real drug? *INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE*, 127 (6), 1109-1123

26 Carreras, H., Calderon-Segura, M., Gomez-Arroyo, S., Murillo-Tovar, M., & Amador-Munoz, O. (2013). Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Cordoba, Argentina. *ENVIRONMENTAL POLLUTION*, 178, 403-410.

27 Carpes, S., de Alencar, S., Cabral, I., Oldoni, T., Mourao, G., Haminiuk, C., y otros. (2013). Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis*

mellifera L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CYTA-JOURNAL OF FOOD* , 11 (2), 150-161.

28 Dominguez-Valhondo, D., Gonzalez-Gomez, D., Hernandez-Mendez, T., & Bohoyo-Gil, D. (2013). Influence of the industrial processing and the floral origin into the volatile constituents of honeybee-collected pollen. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY INTERNATIONAL* , 19 (2), 167-176.

29 Xu, X., Dong, J., Li, T., He, W., & Sun, L. (2013). INFLUENCE OF STORAGE TEMPERATURE ON LIPID OXIDATION, STALE FLAVOR FORMATION AND DISCOLORATION IN LOTUS (NELUMBO NUCIFERA) BEE POLLEN. *JOURNAL OF FOOD PROCESSING AND PRESERVATION* , 37 (2), 171-178.

30 Bashir, M., Lui, J., Palnivelu, R., Naclerio, R., & Preuss, D. (2013). Pollen Lipidomics: Lipid Profiling Exposes a Notable Diversity in 22 Allergenic Pollen and Potential Biomarkers of the Allergic Immune Response. *PLOS ONE* , 8 (2), e57566

31 Cramer, L., & Beuerle, T. (2012). Detection and Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in Antibacterial Medical Honeys. *PLANTA MEDICA* , 78 (18), 1976-1982.

32 Rodriguez-Carrasco, Y., Font, G., Manes, J., & Berrada, H. (2013). Determination of Mycotoxins in Bee Pollen by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 61 (8), 1999-2005.

33 Xu, X., Gao, Y., & Sun, L. (2012). Free and esterified triterpene alcohol composition of bee pollen from different botanical origins. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, 48 (2), 650-656.

34 Kremer, D., Dunkic, V., Stesevic, D., Kosalec, I., Ballian, D., Bogunic, F., y otros. (2014). Micromorphological traits and essential oil of *Micromeria longipedunculata* Brauchler (Lamiaceae). *CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF BIOLOGY*, 9 (5), 559-568.

35 Kremer, D., Dunkic, V., Ruscic, M., Matevski, V., Ballian, D., Bogunic, F., y otros. (2014). Micromorphological traits and essential oil contents of *Micromeria kernerii* Murb. and *M. juliana* (L.) Benth. (Lamiaceae). *PHYTOCHEMISTRY*, 98, 128-136.

36 Qin, P., Tu, B., Wang, Y., Deng, L., Quilichini, T., Li, T., y otros. (2013). ABCG15 Encodes an ABC Transporter Protein, and is Essential for Post-Meiotic

Anther and Pollen Exine Development in Rice. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* , 54 (1), 138-154

37 Kempe, K., Rubtsova, M., Riewe, D., & Gils, M. (2013). The production of male-sterile wheat plants through split barnase expression is promoted by the insertion of introns and flexible peptide linkers. *TRANSGENIC RESEARCH* , 22 (6), 1089-1105.

38 Suinyuy, T., Donaldson, J., & Johnson, S. (2013). Patterns of odour emission, thermogenesis and pollinator activity in cones of an African cycad: what mechanisms apply? *ANNALS OF BOTANY* , 112 (5), 891-902.

39 Obermeyer, G., Fagner, L., Lang, V., & Weckwerth, W. (2013). Dynamic Adaption of Metabolic Pathways during Germination and Growth of Lily Pollen Tubes after Inhibition of the Electron Transport Chain. 162 (4), 1822-1833.

40 More, M., Cocucci, A., & Raguso, R. (2013). THE IMPORTANCE OF OLIGOSULFIDES IN THE ATTRACTION OF FLY POLLINATORS TO THE BROOD-SITE DECEPTIVE SPECIES JABOROSA ROTACEA (SOLANACEAE). *INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT SCIENCES* , 174 (6), 863-876.

41 Mohamadi, M., Shamspur, T., & Mostafavi, A. (2014). Comparison of the essential oil content and composition of the spathe, buds and pollen of *Phoenix dactylifera*. *NATURAL PRODUCT RESEARCH* , 28 (3), 205-207.

42. Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., Wiest, L., y otros. (2013). Widespread Occurrence of Chemical Residues in Beehive Matrices from Apiaries Located in Different Landscapes of Western France. *PLOS ONE* , 8 (6), e67007.

43. Markiewicz-Zukowska, R., Naliwajko, S., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczynska, J., y otros. (2013). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BEEBREAD, AND ITS INFLUENCE ON THE GLIOBLASTOMA CELL LINE (U87MG). *JOURNAL OF APICULTURAL SCIENCE* , 57 (2), 147-157.

44 Kus, P., Jerkovic, I., Tuberoso, C., & Sarolic, M. (2013). The Volatile Profiles of a Rare Apple (*Malus domestica* Borkh.) Honey: Shikimic Acid-Pathway Derivatives, Terpenes, and Others. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* , 10 (9), 1638-1652.

45 Panseri, S., Manzo, A., Chiesa, L., & Giorgi, A. (2013). Melissopalynological and Volatile Compounds Analysis of Buckwheat Honey

from Different Geographical Origins and Their Role in Botanical Determination.

JOURNAL OF CHEMISTRY , 904202.

46 Torres-Perea, C., Munoz-Rodriguez, D., Medina-Peralta, S., Carrera-Figueiras, C., & Moguel-Ordóñez, Y. (2013). Recovery evaluation of organophosphorus pesticides from bee pollen by matrix solid-phase dispersion extraction using sorbents based on silica and titania. *THIRD CONGRESS ON MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING (CNCIM-MEXICO 2012)*, 45, pág. UNSP 012017. México.

47 Dunkic, V., Kremer, D., Muller, I., Stabentheiner, E., Kuzmic, S., Grubescic, R., y otros. (2012). Chemotaxonomic and Micromorphological Traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* , 9 (12), 2825-2842.

48 Jovanov, P., Guzsvany, V., Franko, M., Lazic, S., Sakac, M., Milovanovic, I., y otros. (2014). Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC-MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL* , 55, 11-19.

49 Stoner, K., & Eitzer, B. (2013). Using a Hazard Quotient to Evaluate Pesticide Residues Detected in Pollen Trapped from Honey Bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *PLOS ONE* , 8 (10), e77550.

50 Chen, J., & Mullin, C. (2014). Determination of nonylphenol ethoxylate and octylphenol ethoxylate surfactants in beehive samples by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *FOOD CHEMISTRY* , 158, 473-479.

51 Barriada-Bernal, L., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Gallardo-Velazquez, T., Avila-Reyes, J., Torres-Moran, M., y otros. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CYTA-JOURNAL OF FOOD* , 12 (2), 105-114.

52 Tomazic, P., Birner-Gruenberger, R., Leitner, A., Obrist, B., Spoerk, S., & Lang-Loidolt, D. (2014). Nasal mucus proteomic changes reflect altered immune responses and epithelial permeability in patients with allergic rhinitis. *JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY* , 133 (3), 741-750.

53 Reinmuth-Selzle, K., Ackaert, C., Kampf, C., Samonig, M., Shiraiwa, M., Kofler, S., y otros. (2014). Nitration of the Birch Pollen Allergen Bet v 1.0101:

Efficiency and Site-Selectivity of Liquid and Gaseous Nitrating Agents. *JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH*, 13 (3), 1570-1577.

54 Xue, X., Selvaraj, J., Zhao, L., Dong, H., Liu, F., Liu, Y., y otros. (2014). Simultaneous Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Bee Pollen by Low-Temperature Fat Precipitation and Immunoaffinity Column Cleanup Coupled with LC-MS/MS. *FOOD ANALYTICAL METHODS*, 7 (3), 690-696.

55 Cramer, L., Schiebel, H., Ernst, L., & Beuerle, T. (2013). Pyrrolizidine Alkaloids in the Food Chain: Development, Validation, and Application of a New HPLC-ESI-MS/MS Sum Parameter Method. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 61 (7), 11382-11391.

56 Bosco, R., Caser, M., Vanara, F., & Scariot, V. (2013). Development of a Rapid LC-DAD/FLD Method for the Simultaneous Determination of Auxins and Absciscic Acid in Plant Extracts. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 61 (46), 10940-10947.

57 Shen, Y., Chen, Y., Liu, H., Chiang, F., Wang, Y., Hou, L., y otros. (2014). Expression of a gene encoding beta-ureidopropionase is critical for pollen germination in tomatoes. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 150 (3), 425-435

58 Almaraz-Abarca, N., Rivera-Rodriguez, D., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Sanchez-Gonzalez, J., Delgado-Alvarado, A., y otros. (2013). Pollen phenols of the genus Zea. *ACTA BOTANICA MEXICANA* , 105, 59-85.

59 Almaraz-Abarca, N., Gonzalez-Elizondo, M., Campos, M., Avila-Sevilla, Z., Delgado-Alvarado, E., & Avila-Reyes, J. (2013). VARIABILITY OF THE FOLIAR PHENOL PROFILES OF THE AGAVE VICTORIAE-REGINAE COMPLEX (AGAVACEAE). *BOTANICAL SCIENCES* , 21 (3), 295-306.

60 Vacillotto, G., Favretto, D., Seraglia, R., Pagiotti, R., Traldi, P., & Mattoli, L. (2013). A rapid and highly specific method to evaluate the presence of pyrrolizidine alkaloids in Borago officinalis seed oil. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY* , 48 (10), 1078-1082.

61 Zheng, S., Ma, Z., Ye, J., Wang, G., Wang, R., Zhou, H., y otros. (2014). Determination of three triterpene alcohols in rat plasma after oral administration of pollen of Brassica campestris based on the utilization of fetal bovine serum as surrogate matrix. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES* , 944, 11-

62 Chen, M., Collins, E., Tao, L., & Lu, C. (2013). Simultaneous determination of residues in pollen and high-fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* , 405 (28), 9251-9264

63 Fanali, C., Dugo, L., & Rocco, A. (2013). Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: Determination of polyphenols in bee pollen. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* , 1313, 270-274.

⁶⁴ Zhang, X., Piao, Y., Cui, S., & Lee, Y. (2014). Determination of reduced glutathione, cystein and total thiols in pine pollen powder by in situ derivatization. *MICROCHEMICAL JOURNAL* , 112, 1-6

65 Selzle, K., Ackaert, C., Kampf, C., Kunert, A., Duschl, A., Oostingh, G., y otros. (2013). Determination of nitration degrees for the birch pollen allergen Bet v 1. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* , 405 (27), 8945-8949.

66 Fan, S., Lu, G., Yang, Y., Xiao, W., Wang, Z., Ding, G., y otros. (2013). Optimized Extraction and High Selective Purification of Flavonoids and Intermediate Polar Nitrogen-Containing Constituents from *Brassica campestris* L. Pollen. *SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY* , 48 (15), 2352-2362

67 Freifelder, D. (1991). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. San Francisco: Reverté.

68 Jiang, J., Yao, L., Yu, Y., Liang, Y., Jiang, J., Ye, N., y otros. (2014). PECTATE LYASE-LIKE 9 from *Brassica campestris* is associated with intine formation. *PLANT SCIENCE*, 229, 66-75.

69 Jiang, J., Yao, L., Yu, Y., Lv, M., Miao, Y., & Cao, J. (2014). PECTATE LYASE-LIKE10 is associated with pollen wall development in *Brassica campestris*. *JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY*, 56 (11), 1095-1105.

70 Chu, P., Liu, H., Yang, Q., Wang, Y., Yan, G., & Guan, R. (2014). An RNA-seq transcriptome analysis of floral buds of an interspecific *Brassica* hybrid between *B-carinata* and *B-napus*. 27 (4), 225-237.

71 Celep, F., Kahraman, A., Atalay, Z., & Dogan, M. (2014). Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION*, 300 (9), 1945-1958

72 Piwowarczyk, R., Halamski, A., & Durska, E. (2014). Seed and pollen morphology in the *Orobanche alsatica* complex (Orobanchaceae) from central

Europe and its taxonomic significance. *AUSTRALIAN SYSTEMATIC BOTANY* , 27 (2), 145-157.

73 Komai, F., Okada, K., Inoue, Y., Yada, M., Tanaka, O., & Kuwabata, S. (2014). SEM Observation of Wet Lily Pollen Grains Pretreated with Ionic Liquid. *JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE* , 83 (4), 317-321

74 Stanski, C., Fernandes Pinto Luz, C., Nogueira, A., & Koch Fernandes de Souza Nogueira, M. (2013). Palynology of species in the Astereae and Heliantheae tribes occurring in the region of Campos Gerais, Paraná State, Brazil. *Iheringia* , 68 (2), 203-21.

75 Rueangsawanga, K., Chantaranonthai, P., & Simpson, D. A. (2013). Pollen morphology of *Justicia* L. (Acanthaceae) from Thailand and its taxonomic value. *Grana* , 52 (4), 275-288.

76 Quilichini, T., Douglas, C., & Samuels, A. (2014). New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis thaliana*. *ANNALS OF BOTANY* , 114 (6), 1189-1201.

77 Scott, K., Morgan, R., Jones, V., & Cameron, N. (2014). The transferability of diatoms to clothing and the methods appropriate for their collection and analysis in forensic geoscience. *241*, 127-137

78 Espositoa, V., Lucarielloa, A., Savaresea, L., Cinellib, M., Ferraraccioc, F., Biancod, A., y otros. (2012). Morphology changes in human lung epithelial cells after exposure to diesel exhaust micron sub particles (PM1.0) and pollen allergens. *Environmental Pollution* , *171*, 162-167

79 Saeed, I., Ahmad, M., Aboozar, H., & Parisa, J. (2013). A comparative study on the allergenicity, structure, and ultrastructure of two Acacia pollen grains in guinea pigs. *Aerobiologia* , *29*, 333-339.

80 Taala, L., Majd, A., Nourizadeh, M., & Pourpak, Z. (2014). Identifying the Allergenicity of Maize Pollen in Iran. *ARCHIVES OF IRANIAN MEDICINE* , *17* (7), 490-494.

81 Lu, Q., Wu, J., Yu, Q., & Feng, Y. (2014). Using pollen grains as novel hydrophilic solid-phase extraction sorbents for the simultaneous determination of 16 plant growth regulators. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* , *1367*, 39-47.

82 Zavialova, N., Gordenko, N., Nosova, N., & Polevova, S. (2014). The fine morphology of pollen grains from the pollen chamber of a supposed ginkgoalean seed from the Middle Jurassic of Uzbekistan (Angren locality). *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION* , 300 (9), 1995-2008

83 Liu, X., Manchester, S., & Jin, J. (2014). ALNUS SUBGENUS ALNUS IN THE EOCENE OF WESTERN NORTH AMERICA BASED ON LEAVES, ASSOCIATED CATKINS, POLLEN, AND FRUITS. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY* , 101 (11), 1925-1943

84 Power, R., Salazar-Garcia, D., Wittig, R., & Henry, A. (2014). Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. *JOURNAL OF ARCHAEOLOGICAL SCIENCE* , 49, 160-169.

85 Cabrera Sierra, M. (2011). *Cuantificación de alérgenos de poaceae, oleaceae, platanaceae y cupressaceae en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación (2009-2010) (ejemplo-polen-Madrid)*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

86 Wittch, F. (1950). RESPIRATORY TRACT ALLERGIC EFFECTS FROM CHEMICAL AIR POLLUTION. *ARCHIVES OF INDUSTRIAL HYGIENE AND OCCUPATIONAL MEDICINE* , 2 (3), 329-334.

87 Friedlaender, S., & Friedlaender, A. (Julio-Agosto de 1954). Effectiveness of a portable electrostatic precipitator in elimination of environmental allergens and control of allergic symptoms. *Annals of allergy* , 419-28.

88 Peuschel, H., Sydlik, U., Grether-Beck, S., Felsner, I., Daniel, S., Sascha, J., y otros. (2012). Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signalling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation. *Particle and fiber toxicology* , 9 (48).

89 Jonathan A. Patz, M., Howard Frumkin, M., Tracey Holloway, P., Daniel J. Vimont, P., & Andrew Haines, M. M. (2014). Climate Change Challenges and Opportunities for Global Health. *Journal of the American Medical Association* , 312 (15), 1565-1580.

90 G. Mazzeella, F. F. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: An in vitro study. *Respiratory Medicine* , 101 (6), 1155-1162.

91 Becker S, S. J. (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol.* , 141 (2), 637-48.

92 Monn C, B. S. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* , 155 (3), 245-52

93 Robert J. Pritchard, A. J. (1996). Oxidant Generation and Lung Injury after Particulate Air Pollutant Exposure Increase with the Concentrations of Associated Metals. *Inhalation Toxicology* , 8 (5), 457-477.

94 Kim, H., & Bernstein, J. A. (2009). Air pollution and allergic disease. *Current Allergy and Asthma Reports* , 9 (2), 128-133

95 Robert E. Dales, M. M. (2004). Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 113 (2), 303-306.

96 Szu-Pin Hsu, K.-N. L.-T.-P.-M. (2009). Prenatal risk factors and occurrence of allergic rhinitis among elementary school children in an urban city. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* , 73 (6), 807-810.

97 P.Brock Williams, P. M. (1995). Latex allergen in respirable particulate air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 95 (1), 88-95.

98 Tagiyeva, N., & Sheikh, A. (2014). Domestic exposure to volatile organic compounds in relation to asthma and allergy in children and adults. *Clinical Immunology* , 10 (12), 1611-1639.

99 Kim, B.-J., Lee, S.-Y., Hyo-Bin Kim, E. L., & Hong, S.-J. (2014). Environmental Changes, Microbiota, and Allergic Diseases. *Journal List Allergy & Asthma Immunology Reserach* , 6 (5), 389-400.

100 Jenerowicz D, S. W.-P.-M.-H. (2012). Environmental factors and allergic diseases. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* , 19 (3), 475-481.

101 D'Amato G, L. G. (2002). Respiratory allergic diseases induced by outdoor air pollution in urban areas. *Monaldi Arch Chest Dis.* , 57 (3-4), 161-163.

102 David Diaz-Sanchez, P. M. (1999). Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *104* (6), 1183-1188.

103 Li YJ, T. H. (2010). Nrf2 is closely related to allergic airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clinical Immunology* , 137 (2), 234-41.

104 Xiao GG, W. M. (2003). Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem.* , 278 (50).

105 Andre E. Nel, M. D.-S. (1998). Enhancement of allergic inflammatory by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system;. (539–554, Ed.) *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 102 (4).

106 Gayo, S. H. (2001). BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE DOS ALERGENOS PRINCIPALES DEL POLEN DE OLIVO:Ole e 1 Y Ole e 9. En S. H. Gayo, *BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE DOS ALERGENOS PRINCIPALES DEL POLEN DE OLIVO:Ole e 1 Y Ole e 9* (pág. 15). Madrid: Universidad Complutense.

107 J.R. Regueiro, C. L. (2006). *Inmunología, Biología y Patología del sistema inmune*. Madrid: Médica Panamericana

108 D'Amato, G. (., Liccardi, G. (., D'Amato, M. (., & Cazzola, M. ((2002). Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL* , 20 (3), 763-776

109 Mazzearella, G., Esposito, V., Bianco, A., Ferraraccio, F., Prati, M., Lucariello, A., y otros. (Febrero de 2012). Inflammatory effects on human lung epithelial cells after exposure to diesel exhaust micron sub particles (PM1.0) and pollen allergens. *ENVIRONMENTAL POLLUTION* , 64-69.

110 Tamay, Z., Akcay, A., Ones, U., Guler, N., Kilic, G. & Zencir, M. (2007). Prevalence and risk factors for allergic rhinitis in primary school children. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARYNGOLOGY* , 71 (3), 463-471.

111 PEARSON, T., DAWSON, H., & LACKEY, H. (1989). NATURAL OCCURRING LEVELS OF DIMETHYLSULFOXIDE IN SELECTED FRUITS, VEGETABLES, GRAINS, AND BEVERAGES. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* , 29 (5), 1089-1091.

112 Goff, G. L., & Ouazzani, J. (2014). Natural hydrazine-containing compounds: Biosynthesis, isolation, biological activities and synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 22 (23), 6529–6544.

113 Everatt, R., Slapsyte, G., Mierauskiene, J., Dedonyte, V., & Bakiene, L. (2013). Biomonitoring Study of Dry Cleaning Workers Using Cytogenetic Tests and the Comet Assay. *JOURNAL OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL HYGIENE*, 10 (11), 609-621.

114 Juan E. Figueruelo, M. M. (2004). La capa de ozono. En *Química física del ambiente y de los procesos medioambientales* (capítulo 8). Barcelona: REVERTÉ SA.

115 Laborde et al. (1994). Derivados del gas de síntesis: fosgeno, isocianatos, ácido acético y alcoholes superiores 5. *Transformación catalítica del gas natural. IV*, 41-48.

116 T. E. Graedel, D. T. (1986). Atmospheric Chemical Compounds: Sources, Occurrence and Bioassay. London: Academic Press INC.

117 (EEUU), EPA. (2007 last revision). *Diethyltoluamide (DEET)-Chemical Summary; U.S. EPA, Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health*. EEUU.

118 Morpholine". Scientific Analysis Laboratories Ltd.

119 "Morpholine Issues in the United Kingdom". Northwest Horticultural Council. September 28, 2010.

120 Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance

liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.

121 (Krishnam.RG), Smouse, T., (Mookherj.bd), M., Reddy, B., & Chang, S. (1967). Identification of 2-pentyl furan in fats and oils and its relationship to reversion flavor of soybean oil. 32 (4), 372-&.

122 Pawliszyn (Editor), Solid-phase microextraction: theory and practice, John Wiley & Sons Inc., Chichester, 1997.

123 Gorecki, T., Yu, X., & Pawliszyn, J. (1999). Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *ANALYST*, 124 (5), 643-649.

124 ZHANG, Z., YANG, M., & PAWLISZYN, J. (1994). SOLID-PHASE MICROEXTRACTION. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 66 (17), A844-A853.

125 Koziel, J. A., & Novak, I. (2002). Sampling and sample-preparation strategies based on solid-phase microextraction for analysis of indoor air. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (12), 840–850

126 Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Ontario, Canadá: WILEY

127 (GFV), F. t. (2012). *Input for a revision of the THC and methane (CH4) emission limits for vehicles equipped with engines running on natural gas Euro 6 Light Duty Vehicles*.

128 M. Aballe, J. R. (1996). Microscopía electrónica de barrido y microanálisis por Rayos X. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

129 Rosaria Costa, L. T. (2013). Multiple headspace-solid-phase microextraction: An application to. *Analytica Chimica Acta* , 770, 1-6

130 Vilma Kraujalytė, E. L. (2013). Characterization of Aronia melanocarpa Volatiles by Headspace-. *Journal of agricultural and food chemistry* , 61, 4728–4736

131 Sergey P. Verevkin, *. V. (2009). Thermochemical and Ab Initio Studies of Biodiesel Fuel Surrogates:1,2,3-Propanetriol Triacetate, 1,2-Ethenediol Diacetate, and 1,2-Ethenediol Monoacetate†. *Ind. Eng. Chem. Res* , 48, 7388–7399..

132 Jvo Siegrist, M. F. (s.f.). Identification of Microorganisms Based on Color. SIGMA ALDRICH .

133 Ernstgard, L. (., Norback, D. (., Nordquist, T. (., Wieslander, G. (., Walinder, R. (., & Johanson, G. ((2013). Acute effects of exposure to vapors of 3-methyl-1-butanol in humans. *INOOR AIR* , 23 (3), 227-235.

134 Chino, S. (., Kato, S. (., Seo, J. (., & Kim, J. ((2013). Measurement of 2-ethyl-1-hexanol emitted from flooring materials and adhesives. *JOURNAL OF ADHESION SCIENCE AND TECHNOLOGY* , 27 (5-6), 659-670.

135 Ikuo Kawasaki, N. S. (2006). Homonuclear Diels–Alder dimerization of 5-ethenyl-2-phenylsulfanyl-1H-imidazoles and its application to synthesis of 12,120-dimethylageliferin. *Tetrahedron* , 62, 10182–10192.

136 Hamit Caner a, E. Y. (2007). Synthesis, characterization and antibacterial activity of poly(N-vinylimidazole) grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers* , 69, 318–325. Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.

137 Bisz, M. B. (2016). A comparative study on the polmerization of 1-octenepromoted by vanadium and titanium complexes supportedby phenoxyimine and salen type ligands. *J Polym Res* (2013) 20:164 , 20-164.

138 Annette Bollmann, *. K. (2004). Ethylene Tetramerization: A New Route to Produce 1-Octene in Exceptionally High Selectivities. *J. AM. CHEM. SOC.* , 126, 14712-14713.

139 Implementation of PC-SAFT and SAFT + Cubic for modeling thermodynamic properties of eight 1-alkenes and their mixtures. (2012). *The Journal of Chemical Thermodynamics* , 155–164.

140 Duk-Ki Kim, 1. C. (2013). Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , VOL. 116 No. 2, 186-192.

141 Bi-cheng Yanga, b. Z.-h.-j.-j.-y. (2013). *Toxicology Letters* , VOL219, 26–34.

142 Saiful Nizam Tajuddin, a. N. (2013). Characterization of the chemical constituents of agarwood oils from Malaysia by comprehensive two-

dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. Mendelev Comm., , VOL 23, 51–52.

143 Kai Yang 1, Y. X. (2011). Toxicity of Rhododendron anthopogonoides Essential Oil and Its Constituent Compounds towards Sitophilus zeamais. Molecules , VOL 16, 7320-7330; doi:10.3390/molecules16097320.

144 Besada, C., Salvador, A., Sdiri, S., Gil, R., & Granell, A. (2013). A combination of physiological and chemometrics analyses reveals the main associations between quality and ripening traits and volatiles in two loquat cultivars. Metabolomics , VOL 9; 324–336.

145 TAYLOR, P. (1989). M-PYROL - A PRACTICAL REPLACEMENT SOLVENT. PLATING AND SURFACE FINISHING , Volume: 76 Issue: 6 Pages: 42-43.

146 María B. Blanco, I. B. (2012). Kinetic Investigation of the OH Radical and Cl Atom Initiated Degradation of Unsaturated Ketones at Atmospheric Pressure and 298 K. J. Phys. Chem , VOL116, 6033–6040; dx.doi.org/10.1021/jp2109972.

147 Hanne Frederiksena, *. J.-M. (2013). Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother–child pairs. International Journal of Hygiene and Environmental Health , VOL 216; 772– 783.

148 Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance

liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.

149 KUNIKI KINO, T. M.-N. (2004). Isolation of Dimethyl Sulfone-Degrading Microorganisms and Application to Odorless Degradation of Dimethyl Sulfoxide. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* , 97 (1), 82-84.

150 Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.

151 Lei-yan, S., Min, Z., Hua, X., & Gang-feng, Z. (2012). Source Profile and Chemical Reactivity of Volatile Organic Compounds from Vehicle Exhaust. *PubMed* , 33 (4), 1071-1079.

152 Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.

153 Andrzejewski, P. K.-H. (2005). he N-nitrosomethylethylamine (NMEA), new disinfection byproducts, formation during water disinfection with chlorine. Iniversity of BATCH , Vol A - Oral Presentations, Pts A and B.

154 Natalia Campillo, P. V.-C.-C. (2011). Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 1218, 1815–1821.

155 Tiffany H. Seyler†, J. G. Quantitation of Urinary Volatile Nitrosamines from Exposure to Tobacco Smoke. *Journal of Analytical Toxicology* , 37 (4), 195-202.

156 Application of solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for measuring chemicals in saliva of synthetic leather workers. (2009). *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 24–32 , 877 (2009), 24-32.

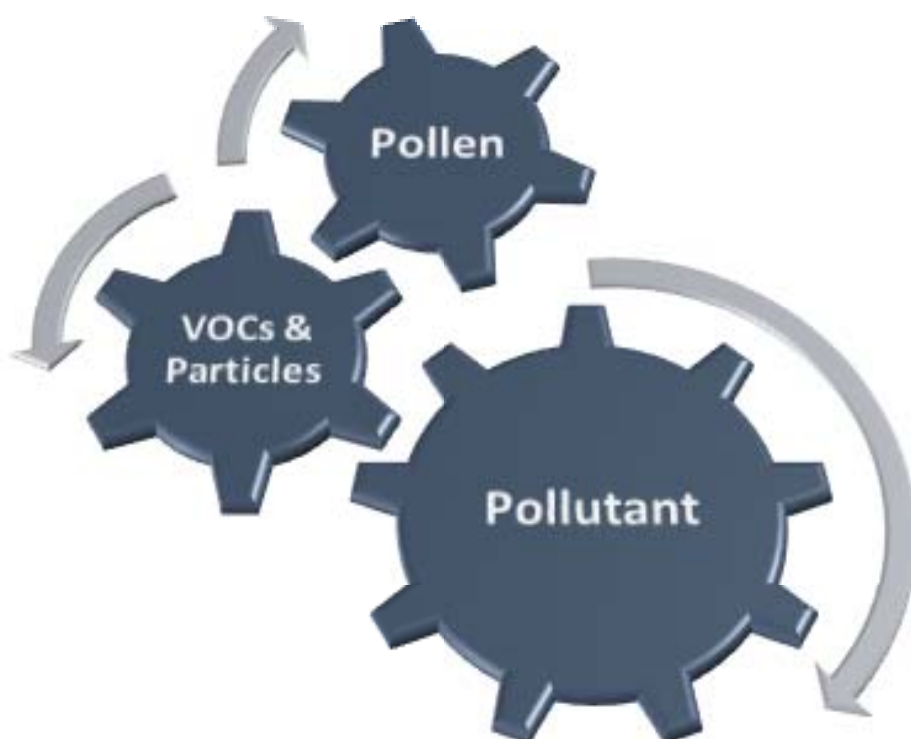
157 Dmitrii L. Obydenov †, E. S. (2013). A novel, two-step synthesis of 4-pyridone-3-carboxamides from 2-cyano-4-pyrones. *Tetrahedron Letters* , 54 (2013), 3085–3087

158 Redlich CA, B. W. (1988). Liver disease associated with occupational exposure to the solvent dimethylformamide. *Department of Internal M. Ann Intern Med* , 108 (5), 680-686.

159 Chaskopoulou, A. (., Pereira, R. (., Scharf, M. (., & Koehler, P. (2009). Vapor Toxicity of Three Prototype Volatile Insecticidal Compounds to House Fly (Diptera: Muscidae). *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY* , 46 (6), 1400-1406.

160 Chaskopoulou, A., Nguyen, S., Scharf, M., & Koehler, P. (2009). Toxicities of 31 Volatile Low Molecular Weight Compounds Against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY* , 46 (2), 328-334.

-
- 161** Zhang L, K. X. (June de 2014). Determination of five imidazole pesticide residues in fruits by Turbo flow online purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography*, 32(6), 559-565.



Julio, 2015